

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA BAĞIRSAK MİKROBİYOTASINDAKİ

*Bacteroides fragilis, Prevotella copri, Bifidobacterium bifidum ve Lactobacillus*

*salivarius* TÜRLERİNİN TEDAVİYE BAĞLI OLARAK DEĞİŞİMİNİN

KANTİTATİF OLARAK ARAŞTIRILMASI

DR. MELİKE DEMİR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

2020

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA BAĞIRSAK MİKROBİYOTASINDAKİ

*Bacteroides fragilis, Prevotella copri, Bifidobacterium bifidum ve Lactobacillus*

*salivarius* TÜRLERİNİN TEDAVİYE BAĞLI OLARAK DEĞİŞİMİNİN

KANTİTATİF OLARAK ARAŞTIRILMASI

DR. MELİKE DEMİR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FETİYE KOLAYLI

ETİK KURUL ONAYI TARİHİ VE SIRA SAYISI: 28/11/2018-2018/311

2020

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	IV
Kısaltmalar Dizelgesi.....	V
Çizelgeler Dizelgesi .....	VII
Çizimler Dizelgesi .....	VIII
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Mikrobiyota.....	3
2.2. Bağırsak Mikrobiyotası .....	4
2.2.1. Bağırsak Mikrobiyotasının Şekillenmesi .....	5
2.2.2. Bağırsak Mikrobiyotasının Fonksiyonları.....	6
2.2.3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Probiyotikler .....	8
2.2.4. Disbiyozisin Hastalıklarla İlişkisi .....	8
2.3. Romatoid Artrit .....	10
2.3.1. Kliniği ve Komplikasyonları.....	10
2.3.2. Etiyolojisi .....	11
2.3.3. Patogenezi .....	13
2.3.4. Tanısı.....	15
2.3.5. Tedavisi ve Takibi.....	17
2.3.6. Epidemiyolojisi ve Prognozu .....	21

2.4.	Mikrobiyota ve Romatoid Artrit.....	21
2.4.1.	<i>Bacteroides fragilis</i> ve Romatoid Artrit.....	23
2.4.2.	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ve Romatoid Artrit .....	24
2.4.3.	<i>Lactobacillus salivarius</i> ve Romatoid Artrit.....	25
2.4.4.	<i>Prevotella copri</i> ve Romatoid Artrit .....	25
2.4.5.	Romatoid Artrit Tedavisi ve Mikrobiyota.....	26
2.5.	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	27
<b>3.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>29</b>
3.1.	Çalışma ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi.....	29
3.2.	Tanı, Tedavi ve İzlem.....	30
3.3.	Hasta Verileri ve Değerlendirme Formu .....	30
3.4.	Dışkı Örneklerinin Toplanması ve Saklanması .....	31
3.5.	Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	31
3.6.	İzole Edilen DNA Miktarının Belirlenmesi ve Eşitlenmesi .....	32
3.7.	Standart Eğrilerin Oluşturulması .....	32
3.8.	Örneklerin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Yöntemiyle Çalışılması .....	34
3.9.	İstatiksel Analiz .....	35
3.10.	Etik Kurul Onayı.....	35
<b>4.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
4.1.	Demografik Veriler ve Laboratuvar Bulguları .....	36

4.2. Takip Edilen Hastaların Takip Sürecindeki Tedavi ve Hastalık Aktivitesi Değişimleri .....	37
4.3. İzole edilen DNA'ların Değerlendirilmesi .....	39
4.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR sonuçları .....	40
4.4.1. Hasta Örneklerinin Değerlendirilmesi .....	40
4.4.2. Yeni Tanı RA'ların ve Sağlıklı Kontrollerin Bakteri Kopya Sayılarının Karşılaştırılması .....	42
4.4.3. RA Hastalarının Tedavi Takiplerindeki Bakteri Değişimleri .....	43
4.4.4. DAS28 ile Bakteri Kopya Sayılarının Korelasyonu .....	47
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>48</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>54</b>
<b>7. ÖZET.....</b>	<b>57</b>
<b>8. ABSTRACT .....</b>	<b>59</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>61</b>
<b>10. EKLER.....</b>	<b>69</b>

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ilgi, destek ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmamın en başından bu yana planlanmasına ve yürütülmesine büyük katkıları olan, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle her daim bana yol gösteren değerli danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI'ya,

Uzmanlık eğitimimin en başından bu yana karşılaştığım her türlü zorlukta bana destek olan, bilgi, tecrübe ve bilimsel desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Fatma BUDAK, Prof. Dr. Sema KEÇELİ, Prof. Dr. Zeki YUMUK, Prof. Dr. Devrim DÜNDAR, Prof. Dr. Murat HÖKELEK ve Dr. Öğr. Üyesi Erdener BALIKÇI'ya,

Hasta örneği toplama sürecindeki yardımlarından dolayı başta Prof. Dr. Ayşe CEFLE ve Prof. Dr. Ayten YAZICI olmak üzere Romatoloji Bilim Dalı doktorlarına, istatistiksel analizlerin yapılması aşamasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Canan BAYDEMİR'e, tez projeme sağladığı destek için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Anlayış, yardım ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin UZUNER, Arş. Gör. Dr. Doğanhan Kadir ER, Dr. Agim OSMANİ, Uzm. Dr. Serpil GENÇ, Uzm. Dr. Fatma Zehra Duymaz, Uzm. Dr. Melike KURT, Arş. Gör. Eda ÖZÇELİK, Dr. Elif OKUMUŞ, Dr. Handan GENEZ, Dr. Merve YILDIZ, Dr. Yılmaz PULCU, Dr. İrem GÜLER, Dr. Yunus ÇÖKERDENOĞLU, Dr. Özlem GÜLER ve laboratuvar teknisyeni arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, ihtiyaç duyduğum her anımda yardımına koşan, sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Nadire GÖKTAŞ, babam Orhan GÖKTAŞ, kız kardeşlerim Filiz ÖZÇELİK, Yeliz DUYMAZ ve Nergis GÖKTAŞ'a,

Sevgisini ve desteğini her daim yanımda hissettiğim hayat arkadaşım Hasan DEMİR ve canım oğlum Deniz DEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Melike DEMİR

## **Kısaltmalar Dizelgesi**

ACPA: Anti-sitr llenmiŐ protein antikor

ACR/EULAR: Amerikan Romatoloji Derneği/Avrupa Romatizma Birliği

CRP: C-reaktif protein

CT: EŞik döngüsü

DAS28: Hastalık aktivite skoru 28

DMARD: Hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç

DNA: Deoksiribonükleik asit

ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı

HLA: İnsan lökosit antijenleri

Ig: İmmünglobülin

IL: İnterlökin

JAK: Janus kinaz

kGZ-PZR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

KZYA: Kısa zincirli yağ asidi

MHC: Majör doku uygunluk kompleksi

MTX: Metotreksat

NF-kB: Nükleer faktör-kappa B

PSA: Polisakkarit A

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RA: Romatoid artrit

RANKL: Nükleer faktör kappa-ligand reseptör aktivatörü

RF: Romatoid faktör

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

T<sub>F</sub>: Foliküler T hücre

T<sub>H</sub>: Yardımcı T hücre

TLR: Toll benzeri reseptör

TNF: Tümör nekroz faktörü

Treg: Regülatör T hücre

VAS: Genel sağlık değerlendirmesi



## Çizelgeler Dizelgesi

1.Çizelge. Disbiyozis ile ilişkili bazı hastalıklar ve ilişkili temel mikrobiyal değişimler. ...	10
2.Çizelge. Romatoid artrit riskini artıran ve azaltan faktörler. ....	13
3.Çizelge. ACR/EULAR 2010 kriterleri. ....	16
4.Çizelge. Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçlar. ....	18
5.Çizelge. DAS28’de değerlendirilen eklemler.....	20
6.Çizelge. DAS28 değerlendirme parametreleri ve sınır değerleri. ....	20
7.Çizelge. Romatoid artrit ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi gösteren bazı çalışmalar.....	22
8.Çizelge. Çalışma grubunda yer alan hastaların belirlenmesinde kullanılan kabul ve ret kriterleri. ....	29
9.Çizelge. Standart eğrilerin değerlendirilmesinde kullanılan verimlilik, eğim ve $R^2$ değerleri.....	34
10.Çizelge. kGZ-PZR’de kullanılan bileşenler ve bileşenlerin tek reaksiyon hacimleri. ...	34
11.Çizelge. kGZ-PZR’de kullanılan ısı düngüleri.....	35
12.Çizelge. Yeni tanı RA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait demografik veriler. ....	37
13.Çizelge. Takip edilen hastaların takip sürecindeki tedavileri.....	38
14.Çizelge. Takip edilen hastaların aylara göre DAS-ESR ve DAS-CRP ortanca değerleri ve karşılaştırmaları. ....	39
15.Çizelge. Yeni tanı RA’ların ve sağlıklı kontrollerin bakteri kopya sayılarının ortanca değerleri.....	43
16.Çizelge. Takip edilen RA hastalarının tedavi takiplerindeki bakteri kopya sayılarının ortanca değerleri. ....	43
17.Çizelge. DAS28 ve test edilen bakteriler arasındaki korelasyon testine ait $p$ değerleri. ....	47

## Çizimler Dizelgesi

1.Çizim. Mikrobiyal bozulmalara yol açan faktörler ve disbiyozis ile ilişkili hastalıklar.....	9
2.Çizim. Romatoid artrit patogenezi.....	15
3.Çizim. DAS28’de değerlendirilen eklemler. ....	20
4.Çizim. Bozulmuş bağırsak mikrobiyotasının RA patogenezindeki immünolojik etkileri. .....	23
5.Çizim. <i>B.fragilis</i> ’in standart eğrisi, standart eğrinin oluşturulmasında kullanılan dilüsyonların amplifikasyon eğrileri ve CT değerleri.....	33
6.Çizim. Takip edilen hastaların aylara göre DAS-ESR ve DAS-CRP değişimleri.....	39
7.Çizim. Örnek amplifikasyon eğrisi ( <i>B.fragilis</i> ). ....	40
8.Çizim. Çalışma boyunca RA hastalarından alınan tüm örneklerle ait amplifikasyon eğrileri ( <i>B.bifidum</i> ). ....	41
9.Çizim. Sağlıklı kontrollerin amplifikasyon eğrileri ( <i>B.bifidum</i> ). ....	41
10.Çizim. Yeni tanı RA’ların ve sağlıklı kontrollerin bakteri kopya sayılarının ortanca değerleri. ....	42
11.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre bakteriyel değişimleri. ....	44
12.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre <i>B.fragilis</i> kopya sayılarındaki değişimler. ....	44
13.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre <i>B.bifidum</i> kopya sayılarındaki değişimler. ....	45
14.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre <i>L.salivarius</i> kopya sayılarındaki değişimler. ....	46
15.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre <i>P.copri</i> kopya sayılarındaki değişimler. .....	46

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bağırsak mikrobiyotasının besinlerin metabolize edilmesi, immünmodülasyon, bağırsak bariyerinin bütünlüğünün korunması gibi birçok farklı görevi bulunmaktadır.<sup>1,2</sup> Mikrobiyal ekosistemi bozacak şekilde, mikrobiyotada kompozisyonel ve fonksiyonel bir değişim meydana gelmesi “disbiyozis” olarak tanımlanmaktadır.<sup>3</sup> Disbiyozisin, hem lokal hem de sistemik inflamasyonu tetikleyerek, farklı klinik özelliklere sahip birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir.<sup>4</sup>

Dünya genelinde en yaygın görülen kronik inflamatuvar hastalıklardan biri olan romatoid artrit (RA); ağrılı sinovyal inflamasyon, kemik erozyonları, immün sistem aktivasyonu ve otoantikorların varlığı ile karakterize, kronik, otoimmün bir hastalıktır.<sup>5,6</sup> Hastalarda genellikle yakın zamanda başlamış eklem tutukluğu, şişliği ve hassasiyeti gibi şikayetler bulunmaktadır. Patogenezinde meydana gelen immün yanıtlar ilerleyici kıkırdak ve kemik hasarına yol açtığından, hastalığın erken tanı ve tedavisi oldukça önemlidir. Tedavide başta hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç (DMARD)’lar olmak üzere birçok farklı ilaç kullanılabilir.<sup>5,7</sup>

Romatoid artrit kesin nedeni bilinmemekle birlikte, etiyolojisinde genetik ve çevresel birçok risk faktörünün rol oynadığı düşünülmektedir.<sup>5</sup> Günümüzde mikrobiyal faktörlerin ve mukozal inflamasyonun da patogeneze rol oynayabileceği bildirilmiştir.<sup>8</sup> Yapılan birçok çalışmada, RA gibi otoimmün hastalıklarda intestinal mikrobiyota kompozisyonunun değiştiği ve çeşitliliğinin azaldığı gösterilmiştir.<sup>9,10</sup> Sağlıklı kontrollerin ve RA’lıların bağırsak mikrobiyotalarının karşılaştırıldığı çalışmalarda, yeni tanı almış hastalarda özellikle *Prevotella copri* (*P.copri*)’nin arttığı belirlenmiştir.<sup>11,12,13</sup> *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* gibi cinslerin RA ile ilişkisi hakkında ise çelişkili yayınlar bulunmaktadır.<sup>11</sup>

Romatoid artrit tedavisinde etkili olabileceği düşünülen çeşitli terapötik maddelerin mikrobiyotayı etkilediği deney hayvanlarında gösterilmiştir.<sup>11</sup> Ayrıca tedavi edilmiş RA hastalarıyla yapılmış sınırlı sayıda çalışmada, bazı DMARD’ların yararlı mikroorganizmalar yönünde değişim sağladığı ve mikrobiyotayı kısmen düzeltebildiği bildirilmiştir.<sup>14,15</sup> Yapılan literatür taramasında, yeni tanı konmuş ve tedavi başlanmış RA

hastalarının tedavi sürecindeki mikrobiyota değişimlerinin incelendiği çok az sayıda prospektif çalışma olduğu görölmüştür.

Bu çalışmada yeni tanı almış RA'lı hastalarda, hastalıkla ilişkisi olduğu bildirilmiş *P.copri*, *Bacteroides fragilis* (*B.fragilis*), *Bifidobacterium bifidum* (*B.bifidum*) ve *Lactobacillus salivarius* (*L.salivarius*) türlerinin tedaviye bağlı değişiminin kantitatif olarak araştırılması amaçlanmıştır. Literatür taramasına göre, bu çalışma dünya genelinde RA hastalarının tedavi takibi yapılarak mikrobiyal değişimlerinin incelendiği nadir çalışmalardan biri olma özelliği taşımaktadır. Ülkemizde ise bu konu ile ilgili yapılmış ilk çalışma olup, elde edilen sonuçlar; RA hastalığında disbiyozisin rolünü ve uygulanan ilaç tedavilerinin bağırsak mikrobiyotasını nasıl etkilediğini anlamamıza yardımcı olacaktır. Ayrıca ilerleyen zamanlarda, bağırsak mikrobiyotasını değiştirmeye yönelik yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine de katkı sağlayabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mikrobiyota

İnsan vücudu sayısız mikroorganizmayı barındıran ekolojik bir niş olup, vücudumuzda yaşayan temel mikrobiyal topluluklar bakteriler, arkealar, virüsler ve mantarlardan oluşmaktadır.<sup>16</sup> Kommensal olarak yaşayan bu mikroorganizmaların tamamına “mikrobiyota”, genlerine ise “mikrobiyom” adı verilmektedir.<sup>17</sup> İçeriğinde 100 trilyonun üzerinde mikroorganizma bulunduğu ve ağırlığının yaklaşık 1.5 kilogram olduğu düşünülmektedir.<sup>16,18</sup> Günümüzde oldukça fazla mikroorganizma içeren mikrobiyotanın insan fizyolojisini önemli şekilde etkilediği bilinmekte ve bir “organ” olarak tanımlanmaktadır.<sup>1</sup>

Mikrobiyota insan vücudunun dış çevreye maruz kalan hemen hemen tüm yüzeylelerinde bulunmaktadır. Sindirim sistemi, oral kavite, deri, genitoüriner sistem ve solunum sistemi gibi bölgeler mikrobiyotanın bulunduğu başlıca vücut bölgeleridir.<sup>19</sup> Hem mikrobiyal kolonizasyon için geniş bir alan hem de mikroorganizmaların üreyebilmesi için zengin bir besi ortamı sağlaması nedeniyle en yoğun kolonizasyon gastrointestinal sistemde olmaktadır. Sadece kolonda insan vücudundaki mikroorganizmaların %70’inden fazlasının bulunduğu tahmin edilmektedir.<sup>19</sup>

Mikrobiyota çalışmalarında kültüre dayalı veya kültürden bağımsız yöntemler kullanılabilir. <sup>20</sup> İçeriğindeki mikroorganizmaların büyük çoğunluğu bakterilerden oluşmaktadır ve bu bakterilerin büyük bir kısmı anaerobik özellik göstermektedir. Anaerobik bakterilerin üretilmeleri oldukça zordur.<sup>21</sup> Ayrıca üretilen bakterilerin özelliklerini incelemek zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu nedenle bu yöntemle mikrobiyotanın sadece %30-50’si tespit edilebilmektedir.<sup>2</sup> Son yıllarda mikrobiyota araştırma yöntemleri, içeriğindeki bileşenlerin ayrıntılı ve eksiksiz karakterizasyonunu sağlayacak şekilde gelişme göstermiştir. Günümüzde çalışmalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) gen dizilemesi gibi kültürden bağımsız moleküler mikrobiyolojik yöntemler tercih edilmektedir.<sup>2,20,22</sup> Bakteriyel genlerin diziliminde 16S rRNA’yı kodlayan deoksiribonükleik asit (DNA) bölgesinin metagenomik analizi yapılmaktadır. Tür ayrımı sağlayan 16S rRNA gen bölgesinde yüksek oranda korunmuş, hipervariable bölgeler bulunmaktadır. Bu bölgelere göre dizileme yapılmakta

ve daha önceden oluşturulmuş kütüphanelere göre biyoinformatik analiz ile değerlendirilmektedir.<sup>2</sup>

Mikrobiyota analizi için yapılan ilk kapsamlı çalışma 2007 yılında Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından başlatılan İnsan Mikrobiyom Projesi'dir. Bu projede metagenomik yöntemler ile insan vücudundaki mikrobiyal taksonların ve genlerin tanımlanması, mikrobiyotanın karakterizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.<sup>23</sup> İnsan Mikrobiyom Proje'si ve sonrasında yapılan birçok kapsamlı çalışma ile günümüzde mikrobiyotanın kompozisyonu ve hastalıklarla ilişkisi hakkında oldukça fazla bilgi edinilmiştir.<sup>24</sup> Buna rağmen halen belirsizliğini koruyan ve araştırılmaya ihtiyaç duyulan birçok konu bulunmaktadır.

## 2.2. Bağırsak Mikrobiyotası

Gastrointestinal sistemde yer alan mikroorganizmaların tamamı bağırsak mikrobiyotası olarak adlandırılmaktadır ve büyük bir kısmı bakterilerden oluşmaktadır.<sup>1,19</sup> Yetişkin bir insanın bağırsağında yaklaşık  $10^{14}$  bakteri hücresi ve 500-1000 arasında bakteri türü bulunduğu tahmin edilmektedir.<sup>19</sup> Farklı bir çalışmada ise, bağırsak mikrobiyotasında 35.000'den fazla bakteri türünün var olduğu gösterilmiştir.<sup>22,25</sup>

Günümüzde bağırsak mikrobiyotasında yer alan 50'den fazla bakteriyel filum tanımlanmıştır.<sup>19</sup> En yoğun bulunan filumlar Gram pozitif Firmicutes ve Gram negatif Bacteroidetes'tir.<sup>22</sup> Bu iki filum, bağırsak mikrobiyotasının %90'ını oluşturmaktadır. Firmicutes filumu, *Clostridium* cinsi (%95) başta olmak üzere, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* ve *Ruminococcus* gibi 200'den fazla farklı cinsten oluşmaktadır. Bacteroidetes filumunda ise *Bacteroides* ve *Prevotella* cinsleri baskın olarak bulunmaktadır.<sup>26</sup> Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria ve Verrucomicrobia nispeten daha az bulunan diğer önemli filumlardır.<sup>27</sup>

Filumlar arasındaki denge, insan sağlığını önemli şekilde etkilemektedir. Yapılan çalışmalar, mikrobiyal denge bozukluklarının obezite, diyabet gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermektedir.<sup>2,17</sup> Çalışmalarda en sık Firmicutes ve Bacteroidetes filumları arasındaki oran araştırılmıştır. Bu oranın özellikle bireylerin beslenme şekline (batı tipi veya sebze ağırlıklı) etkilendiği gösterilmiştir.<sup>28</sup>

### 2.2.1. Bağırsak Mikrobiyotasının Şekillenmesi

Mikrobiyal tür kompozisyonu bireyler arasında büyük farklılıklar göstermekte ve her birey zaman içinde oldukça stabil, benzersiz bir bakteri koleksiyonuna sahip olmaktadır. Bu süreçte doğum şekli, yaş, beslenme, kullanılan ilaçlar gibi birçok faktör mikrobiyotanın şekillenmesini etkilemektedir.<sup>2,22</sup>

Mikrobiyotanın ilk olarak doğum sırasında oluştuğuna inanılmasına rağmen günümüzde intrauterin dönemde de kolonizasyonun başladığını gösteren kanıtlar saptanmıştır. Yapılan sekanslama çalışmaları, mekonyumun *Escherichia*, *Shigella*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* gibi cinsler açısından zengin olduğunu göstermiştir.<sup>2</sup>

Doğum şekli, bakteri profilinin şekillenmesini etkileyen önemli faktörlerden biridir.<sup>2</sup> Vajinal yolla doğan bebeklerin bağırsağı ilk olarak, özellikle maternal vajinada bulunan, *Lactobacillus* ve *Prevotella* cinsleriyle kolonize olmaktadır. Sezaryenle doğarlarda ise, çoğunlukla maternal deri florasında bulunan *Streptococcus*, *Corynebacterium* ve *Propionibacterium* cinsleri baskın olarak bulunmaktadır.<sup>4</sup> Oluşan ilk kolonizasyonun insan sağlığını yaşam boyu etkilediği düşünülmektedir.<sup>19</sup>

Doğum sonrası mikrobiyotanın şekillenmesini etkileyen bir diğer önemli faktör bebeğin beslenme şeklidir. Formül mama ile beslenen bebeklerde *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridia* cinslerinin ve diğer anaerobik streptokokların, anne sütüyle beslenen bebeklerde ise *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinslerinin baskın olduğu belirlenmiştir. *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinsleri insan sütü oligosakkaritleri olarak adlandırılan sindirilemeyen glikanların kolayca parçalanmasını sağladığından, anne sütüyle beslenme insan fizyolojisini olumlu yönde etkilemektedir.<sup>2</sup>

Yetişkinlik döneminde beslenme alışkanlıkları, yaşam şekli, antibiyotik kullanımı gibi birçok faktör mikrobiyotayı etkilemeyi sürdürmektedir.<sup>2</sup> Bu faktörlerden mikrobiyal çeşitliliğin ve zenginliğin oluşmasında en etkili olanı diyetdir.<sup>29</sup> Genel olarak meyve, sebze ve lif açısından zengin bir diyet, bağırsak mikrobiyotasının daha yüksek zenginlik ve çeşitlilikte olmasını sağlamaktadır.<sup>2</sup> Bu tür bir diyetle beslenen bireylerde, sindirilemeyen karbohidratların metabolize edilmesini sağlayan, *Ruminococcus bromii*, *Roseburia* ve *Eubacterium rectale* gibi Firmicutes filumunda yer alan türler daha bol bulunmaktadır. Hayvansal gıdalarla beslenenlerde ise Firmicutes filumunun azaldığı, Bacteroidetes

filumundan *Alistipes spp.* ve *Bacteroides spp.*, *Proteobacteria* filumundan *Bilophila spp.* gibi safraya toleranslı mikroorganizmaların arttığı gösterilmiştir. Coğrafi ve mevsimsel değişiklikler de, beslenme alışkanlıklarını etkilemesi nedeniyle, mikrobiyota üzerinde etkili olabilmektedir.<sup>29</sup> Örneğin, kırsal Afrikalı çocuklarda *Prevotella* cinsi daha fazla iken, Avrupa'daki çocuklarda daha yüksek oranlarda *Bacteroides* cinsi bulunduğu gösterilmiştir.<sup>2</sup>

Antibiyotik kullanımı bağırsak mikrobiyotasının mikrobiyal bileşimini olumsuz yönde etkileyebilen bir faktördür. Konu ile ilişkili en yaygın görülen hastalıklardan biri *Clostridium difficile* (*C.difficile*) enfeksiyonudur. Bazı geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı ile mikrobiyotadaki bakteriyel çeşitlilik azalmakta, böylece *C.difficile* aşırı düzeyde çoğalarak psödomembranöz kolite yol açabilmektedir.<sup>30,31</sup>

### **2.2.2. Bağırsak Mikrobiyotasının Fonksiyonları**

Bağırsak mikrobiyotası içerdiği fazla sayıda bakteri ve sinir hücreleri nedeniyle günümüzde “ikinci beyin” olarak tanımlanmaktadır.<sup>1</sup> Mukoza ile simbiyotik bir ilişki içerisinde olan bağırsak mikrobiyotasının besinlerin metabolize edilmesi, antimikrobiyal aktivite, immünmodülasyon, bağırsak bariyerinin bütünlüğünün korunması ve ilaçların metabolize edilmesi gibi birçok görevi bulunmaktadır.<sup>2</sup>

Lipitler, proteinler, polisakkarit yapıda karbohidratlar gibi karmaşık yapıdaki moleküllerin metabolize edilmesinde mikrobiyotanın önemli katkıları bulunmaktadır.<sup>32</sup> Mikrobiyotadaki bakteriler, besin ihtiyaçlarının büyük bir kısmını diyetle alınan karbohidratlardan sağladıkları için, karbohidrat metabolizmasını daha fazla etkilemektedirler.<sup>2</sup> Proksimal bölgede sindirilmeyen karbohidratlar ve sindirilemeyen oligosakkaritler kolonda bulunan *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* ve *Enterobacteria* cinsleri gibi mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilmektedir. Böylece insan fizyolojisini olumlu yönde etkileyen bütirat, propiyonat ve asetat gibi kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) sentezlenebilmektedir.<sup>2</sup> Oluşan KZYA’lar gastrointestinal epitel hücreleri tarafından alınmakta ve gen ekspresyonu, enerji metabolizması, hücre farklılaşması, iştahın düzenlenmesi gibi birçok genetik ve fizyolojik olaya katkı sağlamaktadırlar.<sup>32</sup> Ayrıca KZYA’lar makrofajları ve dendritik hücreleri modüle eden regülatör T hücrelerinin (Treg) fonksiyonunu artırarak anti-inflamatuvar etki



oluşturmaktadırlar.<sup>33</sup> Bağırsak mikrobiyotası, karbohidrat metabolizmasına ek olarak, adipositlerde lipoprotein lipaz aktivitesinin inhibisyonunu önleyerek lipid metabolizmasını da olumlu yönde etkilemektedir. Ayrıca mikrobiyota bakteriyel proteinazlar, peptidazlar gibi çeşitli enzimler aracılığıyla proteinlerin metabolize edilmesine de katkı sağlamaktadır.<sup>2</sup>

Esansiyel vitaminlerin ve amino asitlerin de novo sentezlenmesi mikrobiyotanın bir diğer önemli görevidir. Laktik asit üreten bakteriler ve bifidobakteriler B vitaminlerinin ve K vitamininin sentezlenmesine katkı sağlamaktadırlar. Vücuttaki lizin yaklaşık %2-20'si bağırsak mikrobiyotası sayesinde sentezlenmektedir.<sup>34</sup> Bakteri hücre duvarının peptidoglikan bileşiminde kullanılan ve biyofilm oluşumunu etkileyen D-amino asitler de bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilmektedir.<sup>35</sup>

Bağırsak epiteli lümeninden kalın ve fizikokimyasal olarak karmaşık bir mukus tabakası ile ayrılmaktadır.<sup>19</sup> Bu mukus tabakası, patojen mikroorganizmaların girişini önleyen bir bariyer görevi görmektedir.<sup>2</sup> Mikrobiyotada yer alan kommensal bakteriler patojen türlerin invazyonunu önleyerek bariyer etkisine katkı sağlamaktadırlar.<sup>22</sup> Bağırsak bariyer bütünlüğündeki bozulmalar, mikrobiyotaya karşı immün toleransın bozulmasına ve inflamatuvar reaksiyonların oluşmasına yol açabilmektedir.<sup>33</sup>

Hem mukozal hem de sistemik bağışıklığın gelişmesinde mikrobiyota oldukça önemli bir role sahiptir. Mikrobiyota içermeyen (germ free) fareler ile yapılan çalışmalarda, bağırsak epitel hücrelerinin ve ilişkili bağışıklık sistemi hücrelerinin normal işleyişinin bozulduğu, mikrobiyal tanıma reseptörlerinin, defensinlerin, antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir.<sup>19</sup> Ayrıca bu farelerde bağırsak ilişkili lenfoid dokuların ve lenfoid foliküllerin gelişiminin kusurlu olduğu, antikor üretiminin bozulduğu, Peyer plaklarının ve mezenterik lenf nodlarının sayılarında ve boyutlarında azalma olduğu tespit edilmiştir.<sup>22</sup>

Bağırsak mikrobiyotasında bulunan mikroorganizmalar ve bunların metabolik ürünleri, immün sistemi sürekli uyarmasına rağmen sağlıklı kişiler bu uyarılara karşı tolerans geliştirebilmektedir. Bağırsaktaki mikrobiyal tanıma ve ilişkili pro-inflamatuvar yollar hem insan hem de bakteri tarafından üretilen birçok inhibitör molekül aracılığıyla baskılanmaktadır.<sup>22</sup> Kommensal bakteriler Treg'ler aracılığıyla immün toleransın

gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca kommensal bakterilerin immün sistemi sürekli olarak uyarması pro-inflamatuvar sitokinlerin baskılanmasını sağlayabilmektedir. Patojen bakteriler ise bağırsak epitel bariyerini aşarak güçlü inflamatuvar reaksiyonların gerçekleşmesine neden olabilmekte ve immün toleransı olumsuz yönde etkileyebilmektedir.<sup>22</sup>

### **2.2.3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Probiyotikler**

Probiyotikler, uygun miktarda kullanıldığında insan sağlığına fayda sağlayabilen canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır.<sup>33</sup> Probiyotik olarak kabul edilen temel bakteriler *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsileridir.<sup>36</sup> Bu bakteriler inflamatuvar bağırsak hastalıkları, irritabl bağırsak sendromu, antibiyotik ilişkili ishal gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Galaktooligosakkaritler ve inülin gibi sindirilemeyen oligosakkaritleri içeren gıda bileşenleri olarak tanımlanan prebiyotikler de probiyotik tedavilerine eklenebilmektedir. Prebiyotikler yararlı etkileri olduğu bilinen KZYA'ların bakteriler tarafından sentezlenmesini ve tedavi etkinliğinin artmasını sağlamaktadırlar.<sup>2,37</sup>

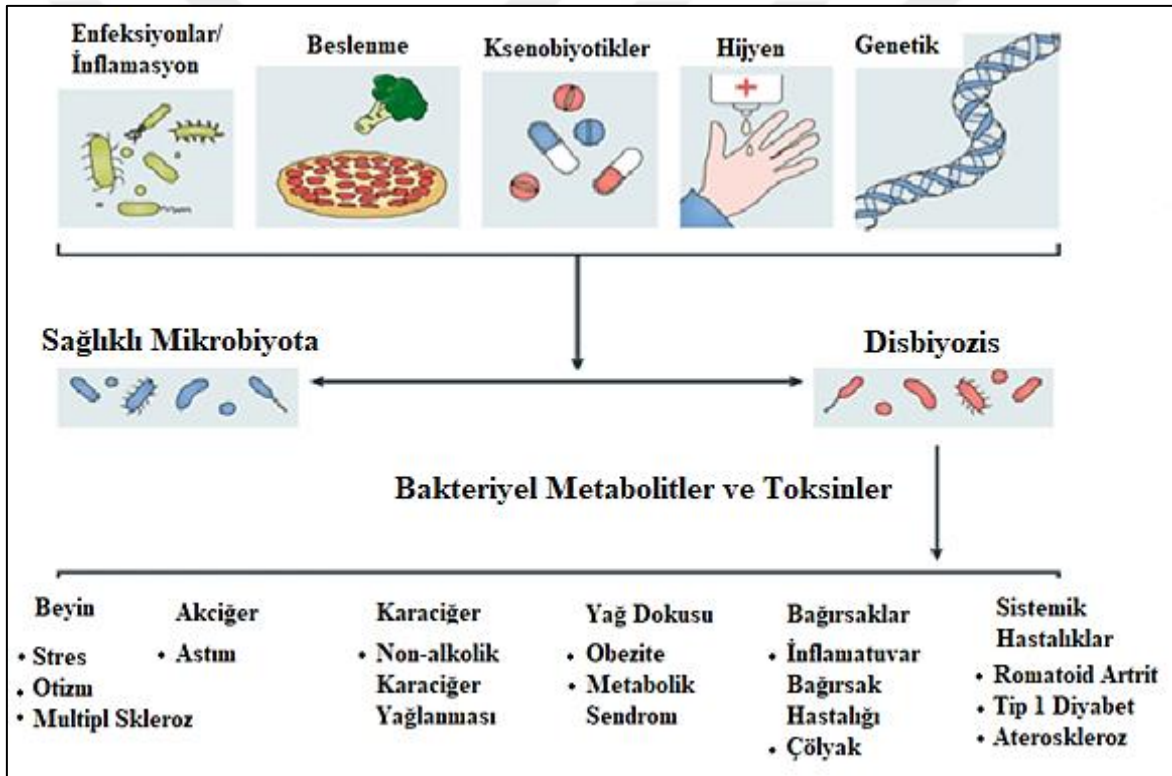
### **2.2.4. Disbiyozisin Hastalıklarla İlişkisi**

Mikrobiyal çeşitlilik, stabilite ve yenilenme gibi parametrelere bakılarak mikrobiyotanın sağlıklı olup olmadığı değerlendirilebilmektedir. Bu özelliklere göre, mikrobiyal ekosistemi bozacak şekilde, mikrobiyotada kompozisyonel ve fonksiyonel bir değişim meydana gelmesi “disbiyozis” olarak tanımlanmaktadır.<sup>3</sup> Disbiyozis hem lokal hem de sistemik inflamasyonu tetikleyerek birçok hastalıkta rol oynayabilmektedir.<sup>4</sup> Bununla birlikte bugün hala disbiyozisin hastalıkların nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu kesin olarak bilinmemektedir.<sup>3</sup>

Disbiyozis patobiyontların artması, kommensal mikroorganizmaların kaybı, mikrobiyal çeşitliliğin azalması olarak üç şekilde meydana gelebilmektedir.<sup>4</sup> Patolojiye neden olabilme potansiyeline sahip mikrobiyota üyeleri olarak tanımlanan “patobiyontlar” normalde mikrobiyotada düşük miktarda bulunmaktadır. Mikrobiyal ekosistemdeki bozulmalar sonucunda patobiyontlar baskın hale geçebilmektedir.<sup>3</sup> İnflamatuvar bağırsak hastalığında *Enterobacteriaceae*'nin çoğalması bu duruma örnek verilebilir. Mikrobiyal

çeşitliliğin azalması, tip 1 diyabette olduğu gibi, disbiyozisin hastalıklarla ilişkisini gösteren bir durumdur.<sup>3</sup> Bazı kommensal bakterilerin mikrobiyotadaki bolluğu hastalığa göre değişiklik gösterebilmektedir. *Prevotella* cinsi bakterilerin multipl sklerozlu hastalarda azaldığı, RA'lı hastalarda ise arttığı gösterilmiştir.<sup>4</sup>

Genetik, beslenme, enfeksiyonlar, ksenobiyotikler, hijyen gibi birçok faktör mikrobiyal bozulmalara yol açabilmektedir (1.Çizim).<sup>3</sup> Bu bozulmaların, farklı klinik özelliklere sahip birçok hastalık ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Disbiyozisle ilişkilendirilmiş bazı hastalıklar ve bağlantılı temel mikrobiyal değişimler 1.Çizelge'de özetlenmiştir.<sup>3,4</sup>



1.Çizim. Mikrobiyal bozulmalara yol açan faktörler ve disbiyozis ile ilişkili hastalıklar.<sup>3</sup>

1.Çizelge. Disbiyozis ile ilişkili bazı hastalıklar ve ilişkili temel mikrobiyal değişimler.

Hastalık Adı	Hastalık ile İlişkili Mikrobiyota Değişimi	Kaynak
<b>Romatoid Artrit</b>	<i>Bacteroides</i> cinsinde azalma (yeni tanı almış hastalarda) <i>Prevotella copri</i> türünde artma (yeni tanı almış hastalarda)	38
<b>Obezite</b>	Firmicutes filumunda artma Bacteroidetes filumunda azalma	39
<b>Tip 1 Diyabet</b>	<i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i> ve <i>Veillonella</i> cinslerinde artma Firmicutes/Bacteroidetes oranında azalma	40
<b>İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları</b>	Firmicutes filumunda azalma Bacteroidetes filumunda ve <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinde artma	41
<b>Alerji</b>	<i>Lactobacillus</i> cinsinde ve <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Helicobacter pylori</i> türlerinde azalma	17
<b>Otizm</b>	Bacteroidetes ve Proteobacteria filumunda artma Firmicutes ve Actinobacteria filumunda azalma	17

## 2.3. Romatoid Artrit

### 2.3.1. Kliniği ve Komplikasyonları

Romatoid artrit; ağırlı sinovyal inflamasyon, kemik erozyonları, immün sistem aktivasyonu ve otoantikorların varlığı ile karakterize, kronik, otoimmün bir hastalıktır.<sup>6</sup> Hastalık sürecinde, sinovyum, kıkırdak ve kemik gibi bölgelerde bulunan öz antijenlere karşı antikorlar oluşmakta ve eklem yıkımı, fonksiyon kaybı gibi hasarlar meydana gelmektedir.<sup>42</sup> Eller ve ayaklardaki sinovyal eklemler hastalıkta ilk etkilenen yapılardır. Hastalığın neden olduğu sistemik inflamasyon birçok organ sisteminde de hasar oluşumuna yol açabilmektedir.<sup>43</sup> Romatoid nodüller, pulmoner tutulum, vaskülit gibi eklem dışı tutulumlar da hastalığa eşlik edebilmektedir. Ayrıca oluşan bu kronik inflamatuvar durum; sekonder amiloidoz, lenfoma, kardiyovasküler hastalık ve mortalite için de risk faktörüdür.<sup>5</sup>

Romatoid artrit bazı hastalarda otoantikörler olmadan da gelişebilmektedir. Anti sitrillenmiş protein antikörlerin (ACPA) ve romatoid faktörün (RF) varlığına göre hastalık seropozitif ve seronegatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.<sup>8</sup> Seropozitif hastalarda saptanan ACPA'lar hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır ve radyografik progresyon ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle otoantikörlerin varlığı hastalık için kötü prognostik bir faktör olarak kabul edilmektedir ve bu hastalarda daha yoğun bir tedavi uygulaması gerektiği düşünülmektedir. Radyolojik karşılaştırma dışındaki hastalık aktivitesi ölçümlerinde ise iki grup arasında farklılık olup olmadığı henüz belirsiz olan bir konudur.<sup>44</sup> Yapılan bazı çalışmalarda seropozitif RA'nın daha şiddetli seyrettiği ve hastalarda daha fazla fonksiyon kaybı geliştiği saptanmıştır. Bu durumun aksine seronegatif olanlarda daha şiddetli inflamatuvar aktive ve daha kötü radyografik sonuçlar olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır.<sup>44</sup>

### **2.3.2. Etiyolojisi**

Romatoid artritin kesin nedeni bilinmemekle birlikte, etiyolojisinde çevresel ve genetik birçok risk faktörünün rol oynadığı düşünülmektedir.<sup>5</sup> Hastalık riskini artıran ve azaltan çeşitli faktörler 2.Çizelge'de özetlenmiştir.<sup>8,33,43</sup>

Genetik yatkınlık RA'nın oluşmasında önemli bir role sahiptir.<sup>45</sup> Gelişen teknolojik yöntemler sayesinde hastalığın genetik etkileri daha anlaşılır hale gelmiştir.<sup>5</sup> Günümüzde RA etiyolojisinde 100'den fazla genetik lokusun rol oynadığı bilinmektedir.<sup>46</sup> Genetik riski artıran en önemli faktörler insan lökosit antijenleri (HLA) polimorfizmleridir.<sup>5</sup> Romatoid artritin özellikle HLA-DRB1 allelleri ile ilişkisi tüm ırksal ve etnik popülasyonlarda gözlenmiştir.<sup>9</sup> Birkaç HLA-DRB1 alleli (DR $\beta$ 1 zincirinin üçüncü bölgesinde yer alan ve ortak epitop olarak adlandırılan genler) daha fazla önem taşımaktadır. Özellikle HLA-DRB1 0401/0404'ün birlikte varlığı hastalık için yüksek risk göstergesidir.<sup>33</sup> Bu aleller ayrıca hastalığın şiddetini de etkilemektedir.<sup>9</sup> Sitokin sinyali, lenfosit reseptörü aktivasyon eşiği gibi diğer genetik lokusların ise daha küçük fonksiyonel etkileri bulunmaktadır.<sup>5</sup> Ortak epitop alelleri özellikle ACPA pozitif RA ile ilişkilendirilmektedir.<sup>9</sup> Genetik faktörlerin etkilerine rağmen, yapılan çalışmalarda monozigotik ikizlerde dahi hastalığın birlikte görülme ihtimalinin %15 düzeyinde olduğu belirtilmektedir. Bu durum, hastalık gelişiminde genetik faktörlerin yanı sıra çevresel risk faktörlerinin de önemli rol oynadığını göstermektedir.<sup>45</sup>

Hastalığın etiolojisinde sigara, hormonlar, beslenme, enfeksiyonlar gibi birçok çevresel risk faktörü sorumlu tutulmaktadır.<sup>33</sup> Bu faktörler içerisinde en önemli olanı tütün maruziyetidir.<sup>45</sup> Ayrıca, yüksek kırmızı et, doymuş/trans yağ, rafine karbohidrat tüketimi ve düşük omega3/omega6 oranı ile karakterize batı tipi beslenme tarzı da RA riskini artırmaktadır.<sup>33</sup>

Otoimmüniteye bağlı olarak oluşan ACPA, RF gibi otoantikorlar, immün sistemin ve inflamatuvar yanıtın uyarılmasına neden olarak, hastalığın oluşumuna katkıda bulunmaktadır.<sup>47</sup> Yapılan son çalışmalara göre, artrit başlangıcından birkaç yıl öncesinde bile otoantikorlar tespit edilebilir düzeyde olabilmektedir.<sup>48</sup> Bu durum, hastalık ile ilgili immün yanıtın çok önceden başladığını göstermektedir.<sup>45</sup> Ayrıca hava kirliliği, toz, diyet (özellikle tuz alımı), enfeksiyonlar gibi çeşitli çevresel faktörlerle de otoantikorların neden olduğu inflamatuvar yanıt tetiklenebilmektedir.<sup>47</sup>

Genetik ve çevresel faktörlerin yanı sıra, günümüzde mikrobiyal faktörlerin ve mukozal inflamasyonun da patogeneizde rol oynayabileceği düşünülmektedir.<sup>8</sup> Epstein-Barr virus, Parvovirus gibi viral patojenlerin ve *Proteus spp.*, *Mycoplasma spp.* gibi bakteriyel patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar RA oluşumunu tetikleyebilmektedir.<sup>43</sup> Yapılan bir çalışmada, RA hastalarının ağız ve bağırsak mikrobiyotalarında, kontrol grubuna göre farklılık olduğu saptanmıştır.<sup>15</sup> Scher ve ark.<sup>38</sup>, yeni tanı almış RA hastalarının bağırsak mikrobiyotasında *P.copri* türünün arttığını, *Bacteroides* cinsi bakterilerin ise azaldığını göstermiştir. Henüz neden-sonuç ilişkisi net olarak açıklanamamış olsa bile, periodontal hastalık varlığında RA riskinin arttığı düşünülmektedir. Periodontitte rol oynayan bir bakteri olan *Porphyromonas gingivalis*, arjinini sitrülline dönüştüren bir enzim olan peptidil arginin deiminaz 4 aracılığıyla sitrüllinasyonu anormal bir şekilde stimüle ederek RA oluşumunu tetikleyebilmektedir.<sup>5,49,50</sup>

## 2.Çizelge. Romatoid artrit riskini artıran ve azaltan faktörler.

RA Riskini Artıran Faktörler	RA Riskini Azaltan Faktörler
Spesifik HLA alellerine sahip olmak	Balık ve omega 3 tüketimi
Kadın olmak	Orta derecede alkol alımı
Sigara dumanına maruziyet	Sağlıklı beslenme
Mesleki toz (Silica)	Statin kullanımı
Yüksek sodyum, kırmızı et ve demir tüketimi	Oral kontraseptif kullanımı veya hormon replasmanı
Hava kirliliği	
Obezite	
Düşük D vitamini	
Çeşitli viral ve bakteriyel enfeksiyonlar	

### 2.3.3. Patogenezi

Hastalığın kesin nedeni halen bilinmemektedir, ancak son yirmi yılda patojenik yollarla ilgili edinilen bilgiler oldukça artmıştır.<sup>51</sup> Doğal ve kazanılmış immün yanıt arasındaki etkileşimlerin, antijen sunan hücrelerin, otoreaktif T hücrelerinin, RF ve ACPA gibi otoantikörlerin RA patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir.<sup>9</sup>

RA, birden çok eklemin sinovyal membranında inflamasyon ile karakterize ve değişen derecelerde yıkıma yol açan kronik otoimmün bir hastalıktır. Özellikle kıkırdak yıkımına, eklem boşluğunun daralmasına ve sonunda kemik hasarına yol açan bu inflamatuvar süreçten vücuttaki her doku etkilenebilmektedir.<sup>52,53</sup> Hastalığın progresyonunda sinovyal doku kalınlaşarak, sinovyumda sıvı artışı ve inflamatuvar hücrelerin birikimi meydana gelmekte ve pannus olarak adlandırılan yapı oluşmaktadır. Pannus tarafından üretilen enzimler kıkırdağı tahrip etmekte, bunun sonucunda inflamatuvar süreç daha da ilerlemektedir.<sup>53</sup>

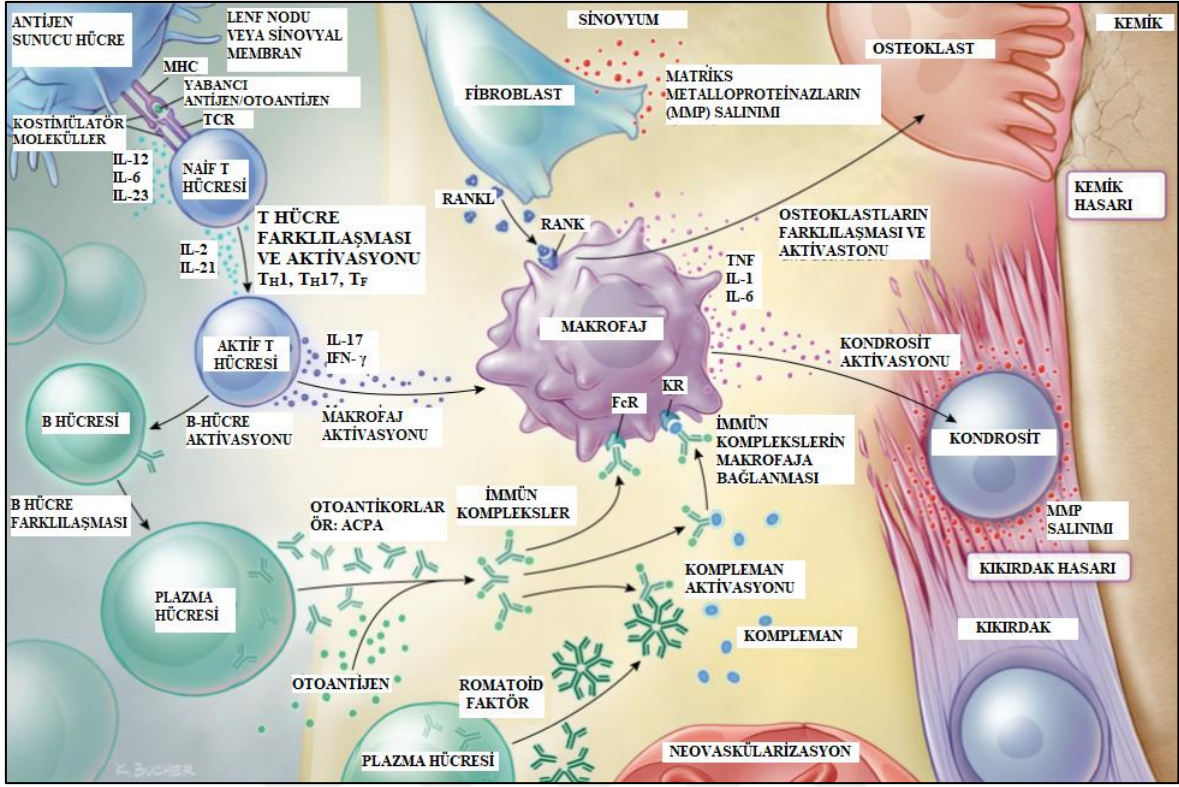
Artrit patogenezinde öncelikle endotelial hücrelerin aktivasyonu meydana gelmektedir.<sup>52</sup> Böylece çok sayıda hücre, çeşitli yapışma moleküllerini eksprese eden endotelial hücreler aracılığıyla sinovyuma girmektedir. Doğal bağışıklık sisteminin antijen

sunma özelliğine sahip dendritik hücreleri, yüzeylerinde taşıdığı Toll-benzeri reseptör (TLR) gibi patern tanıma molekülleriyle yabancı (bakteriyel veya viral peptitler gibi) veya öz antijenleri tanımakta ve aktive olmaktadır. Aktive olmuş dendritik hücreler bu antijenleri ortak epitop taşıyan majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf II moleküller ile naif T hücrelerine sunmaktadır. T hücreleri aktive olduğunda yardımcı T1 (T<sub>H1</sub>), T<sub>H17</sub> veya foliküler T (T<sub>F</sub>) hücrelerine farklılaşmaktadır. Aktive T hücreleri, makrofajları ve B hücrelerini uyaran lenfokinler salgılamaktadır.<sup>51,52</sup> T hücreleri, B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını uyararak otoantikor üretimini de indükleyebilmektedirler. Otoantikorlar otoantijenlere bağlanarak immün kompleksler oluşturmakta ve sinovyumda birirmektedirler.<sup>52</sup> Biriken immün kompleksler, Fc reseptörleri ve kompleman reseptörleri aracılığıyla makrofajlara ve diğer hücrelere bağlanabilmekte ve hücrelerden tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin salınmasına yol açmaktadır. Proinflamatuvar sitokinlerin varlığında nükleer faktör kappa - ligand reseptör aktivatörünü (RANKL) eksprese eden fibroblastlar, preosteoklastların osteoklastlara dönüşümünü ve kemik yıkımını uyarmaktadır. Bu sitokinler ayrıca kıkırdak hasarında rol oynayan enzimleri salgılayan kondrositleri de aktive etmektedirler.<sup>52</sup> Neovaskülarizasyon ve sinovyumdaki fibroblast ve makrofaj benzeri hücrelerin çoğalması RA patogenezinin diğer özellikleridir.<sup>52</sup> Bu hücreler prostaglandinler, matriks metalloproteinazlar gibi inflamatuvar mediatörler salgılayarak kıkırdak ve kemik hasarında rol oynamaktadırlar.<sup>51</sup>

Romatoid artrit patogenezinde TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın merkezi bir rolü bulunmaktadır. TNF- $\alpha$ ; sitokinleri, kemokin ekspresyonunu ve endotel hücre yapışma moleküllerini aktive etmekte, ayrıca anjiyogenezi desteklemektedir. Fibroblastları korumak, Treg'leri baskılamak ve ağrıyı artırmak gibi etkileri de vardır.<sup>43</sup> IL-6; lökosit aktivasyonunu ve otoantikor üretimini teşvik etmektedir. Anemiye, bilişsel işlev bozukluğuna ve lipid metabolizmasının bozulmasına neden olmaktadır.<sup>43</sup> Ayrıca, B hücrelerinin antikor üretimini indüklemekte, T hücrelerini, makrofajları ve osteoklastları aktive etmektedir. Aynı zamanda IL-6 hepatik akut faz reaktanlarının da ana aktivatörüdür.<sup>51</sup>

Sinovyumdaki hücrelerin akışını, genişlemesini ve aktivasyonunu artıran, klinik olarak eklem şişmesi ve eklem yıkımı gibi bulguların ortaya çıkmasına yol açan, hastalığın inflamatuvar ve yıkıcı etkileri 2.Çizim'de özetlenmiştir.<sup>51,52</sup>





2.Çizim. Romatoid artrit patogenezi.<sup>52</sup>

### 2.3.4. Tanısı

Hastalar genellikle yakın zamanda başlamış eklem tutukluğu, şişliği ve hassasiyeti gibi şikayetlerle kliniğe başvurmaktadır. Laboratuvar bulgularında C-reaktif protein (CRP) düzeyinde ve eritrosit sedimentasyon hızında (ESR) yükselme saptanabilmektedir. Bu bulgular hastalığa özgü olmadığı için, RA'nın reaktif artrit, osteoartrit, psöriatik artrit, enfeksiyöz artrit gibi diğer artritlerden ayrımı yapılmalıdır.<sup>5</sup> Hastalığın tanısında fizik muayene bulgularından, laboratuvar tetkiklerinden ve radyolojik tetkiklerden yararlanılmaktadır.<sup>54</sup>

Günümüzde RA tanısında erken dönemde tanı ve tedavi olanağı sağlayan, Amerikan Romatoloji Derneği/Avrupa Romatizma Birliği (ACR/EULAR) 2010 kriterleri kullanılmaktadır.<sup>5</sup> Bu kriterler 3.Çizelge'de gösterilmiştir.<sup>54</sup> Belirtilen kriterlere göre; en az 1 eklemden sinovit olması ve sinoviti daha iyi açıklayan başka bir tanı olmaması durumunda, 6 ve üzeri puan saptanmasıyla kesin RA tanısı konmaktadır. Bu kriterler hastalığın erken tanı ve tedavisini sağlamak ve komplikasyonları önlenmek amacıyla kullanıldığından, eklem erozyonları tanı kriteri arasında yer almamaktadır.<sup>54</sup> Distal

interfalangeal, birinci karpometakarpal eklemler ve birinci metatarsofalangeal eklemler osteoartrit ile ilişkilendirilmeleri nedeniyle tanıda değerlendirilmemektedir.<sup>43</sup>

Otoantikörler tanı esnasında hastaların %50-70'inde saptanan ve hastalık seyri boyunca varlığını sürdüren önemli tanı parametreleridir.<sup>5</sup> Hastalık için daha spesifik olan otoantikör ACPA'dır. RF ise yaşlılık, diğer otoimmün hastalıklar veya enfeksiyon gibi çeşitli durumlarda da pozitifleşebilmektedir.<sup>45</sup>

3.Çizelge. ACR/EULAR 2010 kriterleri.<sup>54</sup>

<b>Eklemler Tutulumu<sup>1</sup></b>	<b>Puan Değeri</b>
1 büyük eklem	0 puan
2-10 büyük eklem	1 puan
1-3 küçük eklem (büyük eklem tutulumu ile birlikte veya tek başına)	2 puan
4-10 küçük eklem (büyük eklem tutulumu ile birlikte veya tek başına)	3 puan
>10 eklem (en az 1'i küçük eklem olmalı)	5 puan
<b>Serolojik Tetkikler<sup>2</sup> (en az 1 test sonucu olmalı)</b>	
RF ve ACPA negatifliği	0 puan
RF veya ACPA düşük pozitifliği	2 puan
RF veya ACPA yüksek pozitifliği	3 puan
<b>Akut Faz Reaktanları (en az 1 test sonucu olmalı)</b>	
Normal CRP ve ESR	0 puan
Anormal CRP veya anormal ESR	1 puan
<b>Semptomların Süresi</b>	
<6 hafta	0 puan
≥6 hafta	1 puan

<sup>1</sup> Eklem tutulumunda belirtilen büyük eklemler omuzlar, dirsekler, kalçalar, dizler ve ayak bileklerini, küçük eklemler ise metakarpofalangeal, proksimal interfalangeal, 2.,3.,4.,5. metatarsopfalangeal, başparmak interfalangeal ve el bileği eklemlerini ifade etmektedir.

<sup>2</sup> Serolojik tetkiklerde belirtilen düşük pozitiflik normalin üst limitinden fazla ancak üst limitin ≤3 kat değerleri, yüksek pozitiflik ise normalin üst limitinin >3 kat değerleri ifade etmektedir.

### 2.3.5. Tedavisi ve Takibi

Romatoid artrit patogenezinde meydana gelen immün yanıtlar hastalarda ilerleyici kıkırdak ve kemik hasarına yol açmaktadır.<sup>5,7</sup> Erken tanı ve tedavi hem inflamasyonun kontrol altına alınmasını sağlamakta hem de hasar oluşumunu önlemektedir. Özellikle yüksek hastalık aktivitesine sahip, otoantikörlerin pozitif olduğu ve erken dönemde eklem hasarı gelişen hastalarda optimal tedavi başarısı erken tanı ile elde edilebilmektedir.<sup>5</sup>

Günümüzde RA tedavi protokolleri, farklı uygulama yollarına sahip farklı ilaç sınıflarından ve beraberinde farmakolojik olmayan uygulamalardan oluşmaktadır.<sup>7</sup> Farmakolojik tedavide non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar, glukokortikoidler, konvansiyonel sentetik DMARD'lar, IL-6 reseptör inhibitörleri, Anti-CD20 antikoru, janus kinaz (JAK) inhibitörleri gibi birçok farklı ilaç kullanılabilir.<sup>5,55</sup> RA tedavisinde kullanılan ilaçlar 4.Çizelge'de özetlenmiştir.<sup>52,56,57</sup> Farmakolojik olmayan uygulamalar içerisinde ise en önemlileri; hasta eğitimi, egzersiz ve fiziksel terapilerdir. Ayrıca hastalarda koroner ateroskleroz riski arttığından, sigara kullanımı, hiperlipidemi, hipertansiyon ve obezite gibi ateroskleroz riskini artıran diğer faktörlerin önlenmesine yönelik uygulamalar da tedavide yer almalıdır.<sup>7</sup>

#### 4.Çizelge. Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçlar.

İlaç Grubu	İlaç Adı
Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar	Asetilsalisilat Naproksen Etodolak ...
Kortikosteroidler	Prednizolon Metilprednizolon ...
Konvansiyonel sentetik DMARD'lar	Metotreksat Sulfasalazin Leflunomid Hidroksiklorokin
Hedefe yönelik sentetik DMARD'lar (JAK inhibitörü)	Tofasitinib Barisitinib
Biyolojik DMARD'lar	Etenersept (TNF inh.) İnfliksımab (TNF inh.) Adalimumab (TNF inh.) Tosilizumab (IL-6 reseptör inh.) Ritüksımab (CD20 inh.) Abatasept (CD80/86 -kostimülatör inh.) ...

Tedavide amaç; ağrıların hafifletilmesini, iltihabın kontrol altına alınmasını ve hastaların remisyonda veya en azından düşük hastalık aktivitesinde olmasını sağlamaktır.<sup>7</sup> Bu nedenle, tedavi protokolleri hastalığın aktivite düzeyine göre belirlenmektedir.<sup>5</sup> EULAR'ın önerilere göre, tanı konulduğunda tedaviye konvansiyonel sentetik DMARD'lar ile başlanmalı ve bu grup içerisinde ilk olarak metotreksat (MTX) tercih edilmelidir.<sup>7</sup> İntolerans veya kontrendikasyon gibi nedenlerle MTX'in kullanılmadığı durumlarda ise, leflunomid veya sülfasalazin ile tedaviye başlanmalıdır. Glukokortikoidler kombine şekilde kullanılmak üzere başlangıç tedavisine eklenebilen ilaçlardır. Akut hastalık alevlenmelerinde ağrıyı ve şişliği hızlı bir şekilde gidermek ve inflamasyonu kontrol altına almak amacıyla tercih edilmektedirler.<sup>7</sup> Glukokortikoidlerin kullanım şekli oral veya intraartiküler enjeksiyonlar şeklinde olabilmektedir. Oral kullanımın birçok sistemik yan etkisi bulunduğundan genellikle kısa süreli (3-4 aya kadar) kullanılması tercih

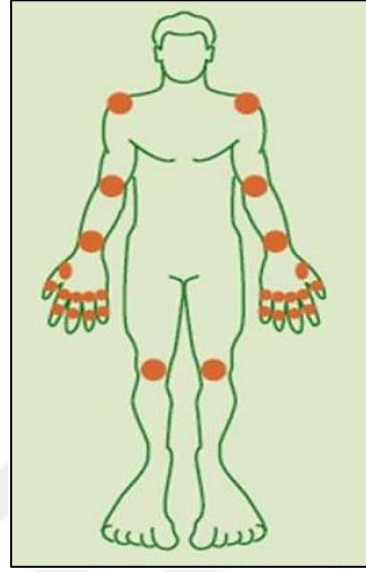
edilmektedir. Uzun vadede inflamasyonu kontrol altına almak için ise DMARD'lar kullanılmaktadır. Biyolojik DMARD'lar özellikle akut faz reaktanlarında yükselme, çok sayıda eklemde şişme veya erken dönemde eklem hasarı oluşma gibi kötü prognostik faktörlerin bulunduğu hastalarda tercih edilmektedir.<sup>7</sup>

Hastaların prognozu, hastalığın ciddiyetine ve tedavinin etkinliğine göre değişmektedir.<sup>43</sup> Tedavi ile hastaların remisyonunda olması hedeflenmektedir. Takiplerde hastalık aktive düzeyine bakılmakta ve hastalık aktivitesi yüksek/orta/düşük aktiviteli veya remisyon şeklinde sınıflandırılmaktadır.<sup>5</sup> Remisyon, iltihaplanmanın önemli belirti ve semptomlarının olmaması olarak tanımlanmaktadır. Tedavi edilmeyen hastalarda %20 veya daha az düzeyde remisyon sağlanırken, tedavinin devamlı uygulanması halinde yaklaşık %75 oranında remisyon/düşük hastalık aktivesi sağlanabilmektedir.<sup>43</sup>

Aktivite düzeyi; hastalık aktivite skoru 28 (*Disease Activity Score 28-DAS28*), basitleştirilmiş hastalık aktivite indeksi, klinik hastalık aktivite indeksi gibi farklı skorlamalar kullanılarak değerlendirilmektedir.<sup>5</sup> Bu skorlamalardan biri olan DAS28 için değerlendirilmesi gereken eklemler 3.Çizim'de ve 5.Çizelge'de gösterilmiştir.<sup>58</sup> DAS28 düzeyinin hesaplanmasında kullanılan parametreler ve sınır değerleri 6.Çizelge'de gösterilmiştir.<sup>5</sup>

5.Çizelge. DAS28’de değerlendirilen eklemler.

Eklem Adı	Sayısı
Omuz	2
Dirsek	2
El Bileği	2
Diz	2
Metakarpofalangeal	10
Proksimal interfalangeal	10
Toplam Eklem Sayısı	28



3.Çizim. DAS28’de değerlendirilen eklemler.

6.Çizelge. DAS28 değerlendirme parametreleri ve sınır değerleri.

DAS28 Değerlendirme Parametreleri	Sınır Değerler			
	Remisyon	Düşük	Orta	Yüksek
<b>DAS28-ESR</b> Hassas eklem sayısı (28) Şiş eklem sayısı (28) ESR (mm'de) Genel sağlık değerlendirmesi ( <i>Visual analog scale-VAS</i> ) (0-100 mm)	<2.6	2.6-3.2	>3.2- ≤5.1	>5.1
<b>DAS28-CRP</b> Hassas eklem sayısı (28) Şiş eklem sayısı (28) CRP (mg/dL) Genel sağlık değerlendirmesi (0-100 mm)	<2.6	2.6-3.2	>3.2- ≤5.1	>5.1

### 2.3.6. Epidemiyolojisi ve Prognozu

Dünya genelinde en yaygın görülen kronik inflamatuvar hastalıklardan biri RA'dır.<sup>5</sup> Popülasyonlara göre değişiklik göstermekle birlikte prevalansının %1-2 civarında olduğu tahmin edilmektedir.<sup>33</sup> Kuzey Yarım Küre'de Güney Yarım Küre'ye göre ve kentsel alanda kırsal alana göre daha yaygın saptanmaktadır. Bazı Amerikan yerlilerinde oldukça sık görülmektedir.<sup>5</sup> Çin ve Japonya ise hastalığın en düşük düzeyde (%0,2-%0,3) görüldüğü ülkelerdendir. Prevalanstaki farklılıkların etiolojide rol alan genetik veya çevresel faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.<sup>43</sup>

Hastalığın görülme sıklığı genetik, cinsiyet, yaş, sigara kullanımı, oral kontraseptif kullanımı gibi çeşitli faktörlere göre değişiklik gösterebilmektedir.<sup>43</sup> Aile öyküsünün varlığı hastalık riskini kabaca 3-5 kat artırmaktadır.<sup>5</sup> Hastalığın görülme sıklığı kadınlarda erkeklere göre 2-4 kat fazladır ve genellikle 35-60 yaş aralığında başlamaktadır.<sup>56,59</sup> Aktif olarak oral kontraseptif kullanan kadınlar, hiç oral kontraseptif kullanmamış kadınlara veya daha önceden kullanmış olanlara kıyasla daha düşük RA insidansına sahiptir.<sup>43</sup> Sigara kullanımı özellikle seropozitif RA ile ilişkili olup yapılan çalışmalar sigaranın RA riskini 2 kattan fazla artırdığını göstermektedir.<sup>8</sup>

Romatoid artrit, karmaşık patofizyolojisiyle sinovyal hiperplaziye, kıkırdak hasarına ve kemik erozyonuna yol açmaktadır ve genellikle tanıdan sonraki bir yıl içinde hastaların %80'ini etkilemektedir. Hastaların üçte biri hastalık başlangıcından sonraki iki yıl içinde ve yaklaşık yarısı on yıl sonra iş gücü kaybı yaşamaktadır.<sup>43</sup> Hastalığın yükü, sadece etkilenen eklemler ve fiziksel etkisi ile sınırlı tutulmamalıdır. Etkileri hastalık süreciyle ilişkili bir dizi sistemik komplikasyona bağlı olarak da gerçekleşmektedir. Eklem dışı RA belirtileri olan özellikle erkek hastalarda daha yüksek mortalite görülmektedir.<sup>43</sup>

### 2.4. Mikrobiyota ve Romatoid Artrit

Yüzyıl kadar önce, RA bulaşıcı bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Yirminci yüzyılın sonlarına doğru, bazı klinik antibiyotik denemeleri etkinlik göstermesine rağmen, bu hipotezden uzaklaşmıştır. Günümüzde ise RA'da mikrobiyal tetikleyicilerin olduğuna dair artan kanıtlar bulunmaktadır.<sup>13</sup> Mikrobiyota ve artrit patogenezi arasındaki ilişki ilk kez 1970'lerin sonunda yapılmış bir hayvan deneyi ile gösterilmiştir. Bu çalışmada; mikropsuz sıçanlarda, normal bağırsak mikrobiyotası olan sıçanlara kıyasla, daha şiddetli

artrit olduğu gözlenmiştir.<sup>60</sup> Yapılan birçok çalışmada RA gibi otoimmün hastalıklarda intestinal mikrobiyota kompozisyonunun değiştiği ve çeşitliliğinin azaldığı gösterilmiştir.<sup>9,10</sup> RA ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmaların bazıları 7.Çizelge’de özetlenmiştir.<sup>11,12,13</sup>

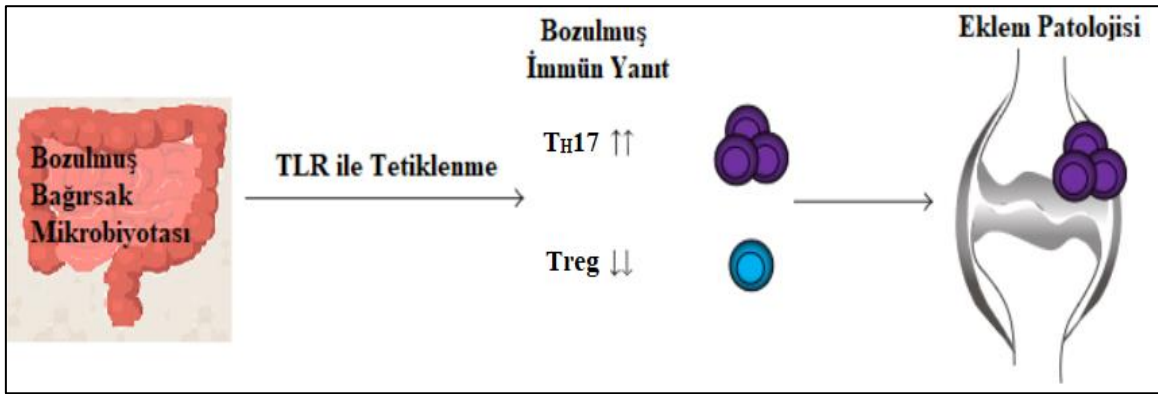
7.Çizelge. Romatoid artrit ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi gösteren bazı çalışmalar.

Popülasyon	Azalan Bakteriler	Artan Bakteriler	Kaynak
Yeni tanı RA (n = 51) Fibromyalji (n = 40)	<i>Bifidobacteria</i> <i>Bacteroides</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Clostridium coccoides</i>	-	61
Yeni tanı RA (n = 15) Sağlıklı kontrol (n =15)	-	<i>Lactobacillus</i>	62
Yeni tanı RA (n = 17) Sağlıklı kontrol (n =14)	-	<i>Prevotella copri</i>	63
Yeni tanı RA (n = 94) Sağlıklı kontrol (n =97)	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Haemophilus</i>	15
Yeni tanı RA (n = 44) Kronik RA (n = 26) Sağlıklı kontrol (n = 28)	<i>Bacteroides</i>	<i>Prevotella copri</i>	38
Preklinik RA (n =83) RA hastalarının 1.derece akrabaları (n = 50)	-	<i>Prevotellaceae</i> <i>Prevotella</i>	64
RA (n =82) Sağlıklı kontrol (n =42)	-	<i>Prevotella</i>	65
RA (n =66) Sağlıklı kontrol (n =60)	<i>Lactobacillus</i> <i>Alloprevotella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Odoribacter</i>	<i>Bacteroides</i> <i>Escherichia-Shigella</i>	66
RA (n =9) Osteoartrit (n =9)	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacterium</i> Bacteroidetes/Firmicutes	<i>Lactobacilli</i> <i>Prevotella</i>	67
RA (n =20) Sağlıklı kontrol (n =30)	<i>Clostridium leptum</i>	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i>	10

RA: Romatoid artrit



Romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda,  $T_H17$  ve Treg arasındaki dengede bozulma sıklıkla gözlenmektedir.  $T_H17$  hücreleri, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı koruma sağlamasına rağmen multipl skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalığı, RA gibi otoimmün hastalıkların oluşumunu tetikleyebilmektedir.<sup>68</sup> Çeşitli hayvan deneylerinde, bağırsak mikrobiyotasındaki bakterilerin immün sistemi etkilediği ve  $T_H17$  hücrelerinin uyarılmasına yol açarak artrit gelişimini tetikleyebileceği gösterilmiştir.<sup>27</sup> Regülatör T hücreleri inflamasyonun baskılanmasında, doku hasarının ve otoimmünitenin önlenmesinde görev almaktadır (4.Çizim).<sup>68</sup>



4.Çizim. Bozulmuş bağırsak mikrobiyotasının RA patogenezindeki immünolojik etkileri.<sup>68</sup>

#### 2.4.1. *Bacteroides fragilis* ve Romatoid Artrit

*Bacteroides* cinsi içerisinde yer alan *B.fragilis* dışkıda baskın olarak bulunan, zorunlu anaerop bir bakteridir. Fırsatçı patojen bir bakteri olmasına rağmen, bağırsakta bulunan immün sistem hücrelerinin dengesinde önemli rolü bulunmaktadır.<sup>69</sup> *B.fragilis* yapısal olarak farklı en az sekiz kapsüler polisakkarit üretebilmektedir. En fazla eksprese edilen polisakkarit A (PSA)'dır.<sup>70</sup> Bu kapsüler polisakkarit dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan TLR-2'ye bağlanmakta ve  $CD4+T$  hücrelerine sunulmaktadır.<sup>4,69</sup> Böylece  $CD4+T$  hücrelerinin IL-10 üreten  $Foxp3+Treg$ 'lere dönüşmesi sağlanmaktadır.  $Foxp3+Treg$ 'ler bağırsaktaki  $T_H17$  hücrelerini ve proinflamatuvar bir sitokin olan IL-17'yi baskılamaktadır.<sup>69,71</sup> Bu bilgiler ışığında PSA'nın çeşitli otoimmün hastalıklar üzerinde koruyucu etkileri olabileceği düşünülmektedir.<sup>71</sup> Kapsüler polisakkaritine bağlı oluşan

düzenleyici etkisine rağmen *B.fragilis*'in otoimmün hastalıklar için tetikleyici olabileceğini gösteren bir çalışma da bulunmaktadır. Çalışmada *B.fragilis*'in normal ökaryotik hücre fonksiyonu için gerekli olan ubiquitin'in homologu bir protein kodlayabildiği ve insan ubiquitini ile çarpaz reaksiyon oluşturarak İmmünglobulin (Ig) G yanıtına yol açabildiği bildirilmiştir.<sup>69</sup>

*B.fragilis*'in RA ile ilişkisini gösteren çalışmalarda birbirinden farklı bulgular elde edilmiştir.<sup>10,61</sup> Vaahtovu ve ark.<sup>61</sup>, RA hastalarında kontrollere kıyasla *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* grubunun, *B.fragilis* alt grubunun, *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides* grubunun ve *Bifidobacteria* cinsinin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Scher ve ark.<sup>38</sup>, yeni tanı almış tedavi edilmemiş RA hastalarında *P.copri* artışının yanı sıra *Bacteroides* cinsinde azalma olduğunu saptamışlardır. Aksine, 2019'da Çin'de yapılan bir çalışmada *Bacteroides* ve *Escherichia-Shigella* cinslerinin kontrol grubuna kıyasla RA hastalarında daha fazla olduğu gösterilmiştir.<sup>66</sup> Farklı bir çalışmada da RA hastalarında *Bacteroides* ve *Prevotella* cinsleri daha fazla saptanmıştır.<sup>10</sup>

#### **2.4.2. *Bifidobacterium bifidum* ve Romatoid Artrit**

*B.bifidum* (*Lactobacillus bifidus*) ilk olarak bebeklerin intestinal sisteminden izole edilen probiyotik bir bakteridir. Kolon mikrobiyotasının önemli bir üyesi olan *B.bifidum* özellikle anne sütü ile beslenen bebeklerde ve çocuklarda yaygın olarak bulunmaktadır.<sup>72</sup> Vaahtovu ve ark.<sup>61</sup>, RA hastalarında kontrol grubuna göre *Bifidobacteria* cinsinin azaldığını saptamışlardır.<sup>61</sup> Yapılan bir hayvan deneyinde, artrit oluşumuna yatkın farelerde *Clostridiales* ailesi ile benzerlik gösteren çok sayıda bakteri, artrit oluşumuna dirençli olanlarda ise bol miktarda *Bifidobacteria* olduğu saptanmıştır. Bifidobakterilerin varlığı bağırsaktaki T<sub>H</sub>17 ekspresyonu ile negatif korelasyon göstermiştir. Bu durum bu gruptaki kommensal bakterilerin artritlen korunmada önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmüştür.<sup>73</sup> RA hastalığı ile ilgili yapılan çeşitli insan ve hayvan deneylerinde bazı probiyotik bakterilerin terapötik etkinliği araştırılmıştır.<sup>53</sup> RA hastalarına *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* ve *B.bifidum*'dan oluşan bir probiyotik karışımın verildiği randomize çift kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, probiyotik takviyesi verilen grubun DAS28'inde düzelme olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu grubun CRP konsantrasyonları plaseboya göre önemli ölçüde azalmıştır.<sup>53</sup> Yukarıda bahsedilen çalışmaların aksine, bir

hayvan deneyinde ise *B.bifidum* tarafından kolonize edilen farelerin hızla artrit geliştirdiği gözlenmiştir.<sup>74</sup>

### 2.4.3. *Lactobacillus salivarius* ve Romatoid Artrit

Laktobasiller immün fonksiyonların düzenlenmesinde ve intestinal mukozadaki epitel hücrelere yapışarak patojen mikroorganizmalara karşı bariyer oluşmasında görev alan probiyotik bakterilerdir.<sup>53</sup> Bununla birlikte çeşitli çalışmalarda RA hastalarında laktobasillerin sayısının arttığı gösterilmiştir.<sup>15,62</sup> Liu ve ark.<sup>62</sup>, erken RA hastalarında sağlıklı bireylere göre *Lactobacillus* cinsinin önemli derecede arttığını saptamışlardır. Bu durumun belirli laktobasil türlerinin artrit gelişiminde rol almasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.<sup>53</sup> Osteoartrit ve RA hastalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, RA hastalarında *Lactobacillus* cinsi daha fazla bulunmuştur.<sup>67</sup> Zhang ve ark.<sup>15</sup>, sağlıklı kontrollere kıyasla RA'lı hastaların dışkı, diş ve tükürük örneklerinde *L.salivarius* türünün daha fazla sayıda bulunduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada yüksek hastalık aktivitesi ile *L.salivarius* sayısı arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır. *L.salivarius*'un, nükleer faktör-kappa B (NF-kB) aktivasyonuna yol açarak, IL-6, IL-1β gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına yol açmasıyla hastalık patogeneğinde rol oynayabileceği bildirilmiştir.<sup>75</sup> Laktobasillerin fazla olmasını açıklayan farklı bir hipotez ise, bakteri sayısındaki artışın RA progresyonundan kaynaklanabilecek olmasıdır. Patojenlere karşı daha kalın bir mukozal bariyer oluşturmak için laktobasil sayısının artmış olabileceği düşünülmüştür.<sup>53</sup> RA hastalarında laktobasil sayısının patolojik olarak arttığını gösteren çalışmaların aksine, artrit oluşumuna karşı koruyucu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan bir hayvan deneyinde RA'lı hastalardan izole edilmiş *L.salivarius*'un oral yoldan farelere uygulanması sonucunda hem Treg hem de IL-10 düzeyinde artış olduğu, aynı zamanda artrit şiddetinde, kemik erozyonlarında ve sinovyal infiltrasyonda azalma olduğu gösterilmiştir.<sup>76</sup> *L.salivarius* dışında farklı laktobasil türlerinin de terapötik amaçlı kullanılabileceği ile ilgili hipotezler bulunmaktadır.<sup>53</sup> *Lactobacillus casei* gibi bazı türlerin RA semptomlarını hafiflettiği gösterilmiştir.<sup>14,77</sup>

### 2.4.4. *Prevotella copri* ve Romatoid Artrit

*Prevotella copri*, ilk olarak Japonya'da insan dışkı örneklerinden izole edilmiş, zorunlu anaerop, sporsuz, gram negatif bir bakteridir.<sup>21</sup> Mikrobiyotanın bir üyesi olan *P.copri*'nin

yeni tanı almış RA'lı hastalarda, kronik RA'lı, psöriatik artritli ve sağlıklı insanlara kıyasla daha bol olduğu belirlenmiştir.<sup>38</sup> Otoantikorları olmayan birinci derece akrabalar ile prelinik RA hastalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, RA hastalarında *Prevotellaceae* ailesinin, özellikle *Prevotella* cinsinin, arttığı gösterilmiştir.<sup>64</sup> Osteoartrit ve RA hastalarının karşılaştırıldığı farklı bir çalışmada da, RA hastalarında *Lactobacillus* ve *Prevotella* cinsleri (özellikle *P.copri*) daha fazla bulunmuştur.<sup>67</sup>

Yeni tanı almış RA hastalarında *P.copri*'nin fazla miktarda olması patogenezdeki immün mekanizmalarla henüz net olarak ilişkilendirilememekle beraber, farelerle yapılan bir çalışmada disbiyozisin bağırsaktaki oloreaktif T hücrelerinin aktivasyonuna yol açarak artrit gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.<sup>63,78</sup> Pianta ve ark.<sup>78</sup>, *P.copri*'nin insanlarda immünojenik olabileceğini belirlemişlerdir. Çalışmada, hastaların sinovyal dokularında veya periferik kandaki mononükleer hücrelerinde, T hücrelere sunulan peptitler arasında *P.copri*'ye ait 27-kD proteinin (Pc-p27) varlığını göstermişlerdir. Bu peptid ile in vitro maruziyet sonrasında RA hastalarının %42'sinde T hücrelerden interferon-gama üretimi gözlenmiş, sağlıklı kontrollerde ve Lyme artritli hastalarda ise T hücre yanıtı saptanmamıştır. Ayrıca RA hastalarında, *P.copri*'nin hem peptidine hem de kendisine karşı artmış IgA antikor yanıtının olduğu ve oluşan antikorların inflamatuvar sitokinlerle de korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler, *P.copri*'nin yeni tanı almış RA hastalarında sadece sayısının artmadığını aynı zamanda immün reaksiyonları da tetiklediğini göstermektedir.<sup>63</sup>

#### **2.4.5. Romatoid Artrit Tedavisi ve Mikrobiyota**

Konakçı bağışıklık sistemi ile etkileşimleri nedeniyle mikrobiyota RA için önemli çevresel tetikleyicilerden biridir. Bu nedenle bağırsağın mikrobiyal kompozisyonunu ve immünolojik dengesini eski haline getirebilecek çeşitli immünosupresif ajanların tedavide kullanılabileceği düşünülmüştür.<sup>11</sup> Bağırsak mikrobiyal bileşimi, DMARD alan RA hastaları ile sağlıklı kontroller arasında oldukça farklılık göstermektedir.<sup>10,14,15</sup> Rodrigues ve ark.<sup>10</sup>, sağlıklı kontrollere kıyasla DMARD alan RA hastalarında *Bacteroides* ve *Prevotella* türlerinin daha fazla, *Clostridium leptum*'un ise daha az olduğunu saptamışlardır. Zhang ve ark.<sup>15</sup>, MTX'in mikrobiyota bileşimini etkileyebileceğini ve kısmen hastalıkla ilişkili disbiyozisin tersine döndürebileceğini bildirmiştir. Farklı DMARD tedavileri uygulanan hastalarla yapılan bir çalışmada, MTX ile tedavi edilenlerde

*Enterobacteriales* ailesinin, etanersept ile tedavi edilenlerde *Deltaproteobacteria* ve *Clostridiaceae* ailelerinin tedavi edilmemiş RA hastalarına göre azaldığı belirlenmiştir.<sup>14</sup> Birçok hayvan deneyinde de RA tedavisinde etkili olabileceği düşünülen çeşitli terapötik maddelerin mikrobiyotayı değiştirebildiği gösterilmiştir.<sup>11</sup> Öte yandan mikrobiyotadaki bakteriler RA tedavisinde kullanılan ilaçların metabolizmasını etkileyebilmekte ve farmakolojik transformasyon, biyoyararlanım ve absorpsiyon gibi olaylarda kilit rol oynayabilmektedir. Buna bağlı olarak disbiyozisin tedavi başarısızlığına neden olabileceği düşünülmektedir. Yeni tanı almış ve MTX tedavisi başlanmış hastaların takip edildiği çalışmada, tedavi başarısı elde edilenlerde bakteriyel çeşitliliğin az olduğu, tedavi başarısızlığı olanlarda ise *Clostridia*'nın daha bol ve *Bacteroidia*'nın daha az bulunduğu saptanmıştır.<sup>75</sup> Sonuç olarak tüm bu bilgiler, RA tedavisinde kullanılan ilaçların mikrobiyota ile karşılıklı olarak etkileştiğini göstermektedir.<sup>75</sup>

## **2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kGZ PZR); elde edilen ürünün görünür hale gelmesini ve monitörizasyonunu sağlayan floresans işaretli prob ve boyaların kullanıldığı ve floresans miktarının oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir PZR yöntemidir.<sup>79</sup> Bu yöntemde, DNA amplifikasyonu ve elde edilen ürünün saptanması tek bir testte gerçekleşmektedir. Böylece konvansiyonel PZR'de amplifikasyon ürünlerinin saptanması için kullanılan jel elektroforezi basamağına ihtiyaç duyulmamaktadır.<sup>80</sup> Bu yöntem, patojenlerin tespitinden onkolojik çalışmalara, doğum öncesi tanı çalışmalarından ilaç endüstrisine kadar birçok farklı alanda kullanılmaktadır.<sup>79</sup>

Gerçek zamanlı PZR'de, konvansiyonel PZR'de olduğu gibi sabit sayıda döngüden sonra biriken DNA miktarının belirlenmesi yerine, ürünün ilk tespit edildiği döngü noktası saptanmaktadır. Bu, işaretli boya yoğunluğunun eşik değerin üzerine çıktığı döngü sayısı ile tespit edilmektedir ve bu döngü sayısı eşik döngüsü (CT) olarak adlandırılmaktadır. CT değeri, PZR reaksiyonundaki hedef kopya sayısı ile ters orantı göstermektedir. Yani, hedef nükleik asitin başlangıç kopya sayısı ne kadar yüksekse, floresansta o kadar erken dönemde artış gözlenmekte ve CT değeri de o kadar düşük olmaktadır.<sup>80</sup>

Gerçek zamanlı PZR'de, amplifiye edilmiş DNA fragmanlarının saptanmasında spesifik olmayan floresans boyalar veya spesifik problar kullanılabilir. SYBR Green I gibi

spesifik olmayan boyaların kullanılmasının avantajı testin daha basit ve düşük maliyetli olmasını sağlamasıdır. Bununla birlikte, bu boyalar nonspesifik bağlanmalar oluşturabilmeleri nedeniyle belirsiz sonuçlara yol açabilmektedirler.<sup>80</sup> Hedefe spesifik problemlerde ise hibridizasyon problemleri, hidroliz problemleri, floresans işaretli problemler, moleküler boncuklar veya Scorpions gibi farklı seçenekler bulunmaktadır. Problemler PZR'deki sadece gerçek hedefler ile hibridize olmakta, primer dimerlerine veya diğer yalancı ürünlere bağlanmamaktadırlar. Bu durum SYBR Green ile elde edilemeyecek düzeyde spesifikite sağlamaktadır. Proba dayalı yöntemlerin bir diğer avantajı da farklı emisyon spektrumuna sahip boyalar kullanılarak çoklu PZR gerçekleştirebilme olanağı sağlamasıdır.<sup>80</sup>

Gerçek zamanlı PZR, kalitatif bir test olarak kullanılabildiği gibi, PCR ürünü ve floresan yoğunluğu arasındaki doğrusal korelasyona dayanarak kantitatif bir yöntem olarak da kullanılabilmektedir.<sup>80</sup> Kantitasyon, standart eğri oluşturarak veya gerçekleştirilen reaksiyonla birlikte internal kontrol mesajcı RNA'yı amplifiye ederek yapılabilmektedir.<sup>81</sup> Standart eğri, başlangıç hedef kopya sayısı bilinen bir standardın seri dilüsyonlarıyla gerçekleştirilen PZR reaksiyonuyla oluşturulmaktadır. Oluşturulan standart eğrinin lineer eğimine göre test edilen örneklerin kopya sayısı hesaplanmaktadır. Bu yöntemde örneklerden elde edilen kopya sayısının doğruluğu, tamamen standartların doğruluğuna bağlıdır. Bu nedenle eğrinin uygunluğu değerlendirilmeli, eğimi hesaplanarak reaksiyonun verimliliği belirlenmelidir. Standart eğriler ile kantitasyonda genellikle yüksek oranda spesifik ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmektedir.<sup>81</sup>

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Çalışma ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi

Çalışma grubu Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Romatoloji Bölümü'ne Aralık 2018- Haziran 2020 tarihleri arasında başvuran, yeni tanı almış RA hastalarından oluşturulmuştur. Hastalar belirlenen kabul ve ret kriterlerine göre seçilmiştir. Bu kriterler 8.Çizelge'de gösterilmiştir. Kriterleri sağlayan 15 hasta çalışma grubuna dahil edilmiştir. Hastalar çalışma öncesinde sözlü olarak bilgilendirilmiş ve aydınlatılmış onam formu ile yazılı onamları alınmıştır. Tedavi takibi yapılan hastaların gönüllülük esasına dayanarak bu süreçte katılımlarının devamlılığı sağlanmıştır.

8.Çizelge. Çalışma grubunda yer alan hastaların belirlenmesinde kullanılan kabul ve ret kriterleri.

<b>KABUL KRİTERLERİ</b>	<b>RET KRİTERLERİ</b>
Hastaların 18-65 yaş aralığında ve yeni RA tanısı almış olması	Hastaların 18 yaşından küçük veya 65 yaşından büyük olması
Öncesinde anti-romatizmal bir tedavi almamış olması	Öncesinde anti-romatizmal bir tedavi almış olması
İnflamatuvar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu gibi herhangi bir bağırsak hastalığının olmaması	İnflamatuvar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu gibi herhangi bir bağırsak hastalığının olması
Farklı bir romatizmal hastalık tanısı almamış olması	Farklı bir romatizmal hastalık tanısı almış olması
Gebelik olmaması	Gebelik olması
Son 2 ay içerisinde herhangi bir antibiyotik kullanmamış olması	Son 2 ay içerisinde herhangi bir antibiyotik kullanmış olması
Son 2 ay içerisinde gastroenterit geçirme öyküsünün olmaması	Son 2 ay içerisinde gastroenterit geçirme öyküsünün olması
Takviye edici prebiyotik/probiyotik ilaç kullanmamış olması	Takviye edici prebiyotik/probiyotik ilaç kullanmış olması

Kontrol grubu, çalışma grubuyla benzer yaş ve cinsiyet özelliklerine sahip sağlıklı gönüllülerden oluşturulmuştur. Bu grupta yer alan bireylerin herhangi bir kronik hastalığının ve düzenli ilaç kullanımlarının olmamasına dikkat edilmiştir. Son iki ay içerisinde antibiyotik kullanımı, gastroenterit öyküsü veya tedavi amaçlı prebiyotik/probiyotik ilaç kullanımı olan hastalar kontrol grubuna dahil edilmemiştir. Kriterlere uygun olduğu belirlenen 14 gönüllü birey kontrol grubunda yer almıştır. Tüm bireyler çalışma öncesinde sözlü olarak bilgilendirilmiş ve aydınlatılmış onam formu ile yazılı onamları alınmıştır.

### **3.2. Tanı, Tedavi ve İzlem**

Hastaların tanısı, tedavisi ve izlemi Romatoloji Bilim Dalı tarafından yapılmıştır. Tanı için ACR/EULAR 2010 kriterleri kullanılmıştır.<sup>54</sup> Hastaların başlangıçta ve kontrol muayenelerinde DAS28 ile hastalık aktivite düzeyleri belirlenmiştir. DAS28 düzeyleri hem ESR hem de CRP sonuçları kullanılarak hesaplanmıştır. Tedavide hastalara sadece MTX veya MTX+kortikosteroid, MTX+kortikosteroid+hidroksiklorokin gibi ilaç kombinasyonları başlanmıştır. Takip süreçlerinde tedavi değişimi olup olmadığı değerlendirilmiştir.

### **3.3. Hasta Verileri ve Değerlendirme Formu**

Hastaların laboratuvar verileri hastane bilgi sisteminden, diğer bilgiler ise değerlendirme formu (Ek-1) ile sözel olarak hastalardan edinilmiştir. Formda hastaların genel bilgilerini, beslenme alışkanlıklarını ve sigara kullanımlarını sorgulamaya yönelik sorular yer almıştır. Beslenme alışkanlıklarının mikrobiyota üzerinde etkili olduğu bilindiğinden, diyetin etkilerini anlamaya yönelik daha ayrıntılı değerlendirme yapılmıştır. Bu amaçla bireylerin ne tür gıdalarla beslenmeyi tercih ettiği sorgulanmış ve et ağırlıklı, sebze ağırlıklı veya dengeli beslenme seçeneklerinden birini tercih etmeleri istenmiştir. Ayrıca bireylerin ne sıklıkla yoğurt, kefir, tarhana, turşu gibi probiyotik içeren gıdaları tükettiği sorgulanmıştır. Tüketim sıklıklarını her gün, haftada birkaç kez, ayda birkaç kez, yılda birkaç kez tüketme veya hiç tüketmeme olacak şekilde derecelendirmeleri istenmiştir. Sigaranın RA için önemli bir predispozan faktör olduğu bilindiğinden hastaların sigara kullanımları sorgulanmıştır. Ayrıca RA hastaları için tedavi ve hastalık aktivitesinin takip edildiği bir



bölüm oluşturulmuştur. Hastalık aktivitesini belirlemek için kullanılan DAS28'in değerlendirilmesinde kullanılan bilgiler forma kaydedilmiştir (Ek-1).

### **3.4. Dışkı Örneklerinin Toplanması ve Saklanması**

Çalışma grubunda yer alan hastalardan 0. ( $\leq 7$  gün), 6. ve 9/12. aylarda olmak üzere toplam 3 kez, kontrol grubunda bulunan sağlıklı bireylerden ise herhangi bir zamanda 1 kez dışkı örneği alınmıştır. Örnekler, steril burgu kapaklı dışkı taşıma kabına alınarak, bekletilmeden, buz aküsü üzerinde Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır.

Gelen dışkı örnekleri buz üzerinde tutularak 0.2 gr olacak şekilde tartılmış ve 2 ml'lik ependorflara porsiyonlanmıştır. Ependorflar hasta bilgilerini içerecek şekilde etiketlenerek, DNA izolasyonu ve PZR testi yapılincaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### **3.5. Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonu**

Dışkı örneklerinden DNA izolasyonunda QIAamp PowerFecal Pro DNA kiti (QIAGEN, Almanya) kullanılmıştır. İzolasyon işlemleri kit protokolüne uygun şekilde oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Uygulanan kit protokolü aşağıda belirtildiği gibidir.

1. Önceden porsiyonlanmış 0.2 gr'lık dışkı örnekleri kit içerisindeki boncuk içeren PowerBead Pro tüplere aktarılmıştır.
2. Üzerine 800  $\mu\text{l}$  CD1 solüsyonu eklenerek kısa bir süre vortekslenmiştir.
3. PowerBead tüpler vorteks üzerine horizontal bir şekilde sabitlenerek maksimum hızda 10 dakika boyunca vortekslenmiştir.
4. 15.000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
5. Yaklaşık 500-600  $\mu\text{l}$  kadar süpernatant temiz 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
6. Üzerine 200  $\mu\text{l}$  CD2 solüsyonu eklenerek 5 saniye vortekslenmiştir.
7. 15.000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
8. Yaklaşık 700  $\mu\text{l}$ 'lik süpernatant temiz 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
9. Üzerine 600  $\mu\text{l}$  CD3 solüsyonu eklenerek 5 saniye vortekslenmiştir.
10. 650  $\mu\text{l}$  lizat MB Spin Column'a aktarılarak 15.000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

11. Alttaki toplama tüpü değiştirildikten sonra kalan lizat MB Spin Column'a aktarılarak 15.000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
12. Alttaki toplama tüpü değiştirildikten sonra MB Spin Column'un üzerine 500 µl EA solüsyonu eklenmiştir.
13. 15.000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
14. Alttaki toplama tüpü değiştirildikten sonra MB Spin Column'un üzerine 500 µl CD5 solüsyonu eklenmiştir.
15. 15.000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
16. Alttaki toplama tüpü değiştirildikten sonra 16.000g'de 2 dakika tekrar santrifüjlenmiştir.
17. Alttaki toplama tüpü değiştirilerek, MB Spin Column 1,5 ml'lik Elüsyon tüpüne yerleştirilmiştir.
18. Üzerine, filtrelili membranın ortasına gelecek şekilde, 50 µl CD6 solüsyonu eklenmiştir.
19. Oda ısısında 2-3 dk inkübe edildikten sonra 15.000g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
20. Elde edilen DNA porsiyonlanarak çalışma gününe kadar -80°C'de saklanmıştır.

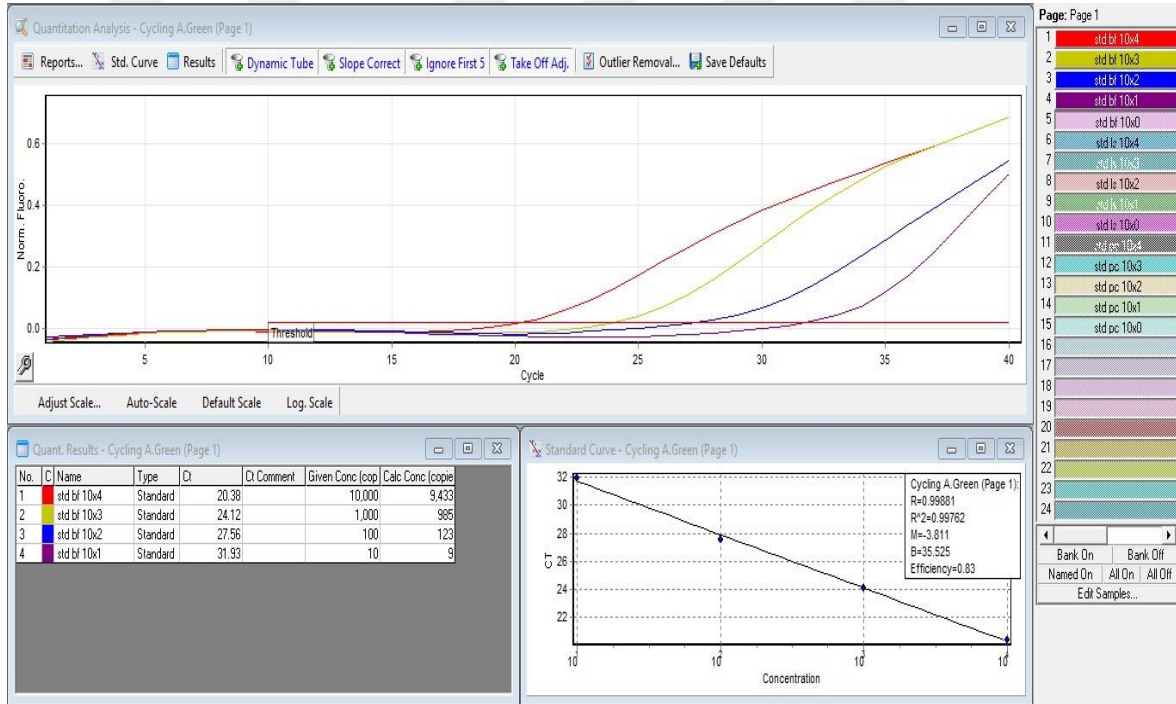
### **3.6. İzole Edilen DNA Miktarının Belirlenmesi ve Eşitlenmesi**

Çalışma ve kontrol grubunda yer alan bireylerin dışkı örneklerinin DNA miktarları nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile ölçülmüştür. Cihaza DNA süspansiyonundan 1 µl pipetlenerek ölçüm yapılmıştır. Örneklerin 260/280 nm dalga boylarındaki ölçümlerine göre yeterli ve uygun saflıkta DNA elde edilip edilmediği değerlendirilmiştir. Tüm örnekler son konsantrasyonları yaklaşık 200 ng/µl DNA olacak şekilde dilüe edilerek eşitlenmiştir.

### **3.7. Standart Eğrilerin Oluşturulması**

Bakteri kopya sayılarını belirlemek amacıyla her bakteri için ayrı standart eğriler oluşturulmuştur. Standart eğrilerin oluşturulmasında 20.000 kopya/µl bakteri DNA'sı içerdiği bilinen bir pozitif kontrol (Microbial DNA positive control-V2-Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Pozitif kontrolden 5 µl alınarak, 5 µl distile su ile karıştırılmıştır. Böylece pozitif kontrolün 1/2 dilüe olması sağlanmıştır ve dilüsyon sonucunda 10.000 kopya/µl

pozitif kontrol elde edilmiştir. Sonrasında 10.000 kopya/μl içeren standart solüsyondan 2 μl alınarak 18 μl distile su ile karıştırılmıştır. Bu basamak tekrar edilerek logaritmik şekilde dilüsyon yapılmış ve 1000, 100, 10 ve 1 kopya/μl DNA içeren diğer standartlar oluşturulmuştur. Standartlar için hazırlanan 20 μl'lik PZR karışımının içeriği 10.Çizelge'de gösterilmiştir. Tüm standartların amplifikasyonunda 11.Çizelge'de gösterilen ısı döngüleri kullanılmıştır. Çalışmalar RotorGene Q (Qiagen, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en uygun değerlere sahip dilüsyonlar kullanılarak standart eğriler oluşturulmuştur. Örnek olarak *B.fragilis* için kullanılan dilüsyonların amplifikasyon eğrileri, CT değerleri ve oluşturulan standart eğri 5.Çizim'de gösterilmiştir. Standart eğrilerin değerlendirilmesinde  $R^2$ , verimlilik ve eğim değerleri kullanılmıştır. Tüm bakteriler için belirlenen değerler 9.Çizelge'de gösterilmiştir.



5.Çizim. *B.fragilis*'in standart eğrisi, standart eğrinin oluşturulmasında kullanılan dilüsyonların amplifikasyon eğrileri ve CT değerleri.

9.Çizelge. Standart eğrilerin değerlendirilmesinde kullanılan verimlilik, eğim ve R<sup>2</sup> değerleri.

	<i>B.fragilis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>L.salivarius</i>	<i>P.copri</i>
<b>R<sup>2</sup> değeri</b>	0,99762	0,99956	0,99380	0,99417
<b>Eğim değeri (M)</b>	-3,811	-3,080	-3,743	-4,176
<b>Verimlilik değeri (E)</b>	0,83	1,11	0,85	0,74

### 3.8. Örneklerin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Yöntemiyle Çalışılması

Kantitatif gerçek zamanlı PZR testi için *B.fragilis*, *B.bifidum*, *L.salivarius* ve *P.copri* türlerinin 16S rRNA bölgesine spesifik primerleri ve prob içeren ticari kitler (Microbial DNA qPCR Assay- QIAGEN, Almanya) kullanılmıştır. Her bir reaksiyon için hazırlanan 20 µl'lik PZR karışımının içeriği 10.Çizelge'de gösterilmiştir. Tüm örneklerin amplifikasyonunda 11.Çizelge'de gösterilen ısı döngüleri kullanılmıştır. Çalışmalar RotorGene Q (Qiagen,Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan PZR çalışmaları sonucunda her reaksiyon için bir eşik döngüsü (CT) saptanmıştır. Dışkı örneklerinden kGZ-PZR ile elde edilen CT'ler önceden oluşturulmuş, kopya sayısı bilinen standart eğrilere göre değerlendirilerek test edilen bakteriye ait kopya sayısı belirlenmiştir.

10.Çizelge. kGZ-PZR'de kullanılan bileşenler ve bileşenlerin tek reaksiyon hacimleri.

<b>PZR Bileşenleri</b>	<b>Tüm reaksiyonlar için uygulanan tek reaksiyon hacmi (µl)</b>
Mikrobiyal PZR Master mix	10
Primer-prob karışımı (Mikrobiyal DNA PZR Assay)	0,8
Distile su	8,2
Standartlar/Örnekler	1
<b>Total hacim</b>	<b>20</b>

11.Çizelge. kGZ-PZR’de kullanılan ısı d ng leri.

Basamak	Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık (�C)
Başlangıç denatürasyonu	1	10 dk	95
Denatürasyon	40	15 sn	95
Bağlanma ve uzama	40	2 dk	60

### 3.9. İstatiksel Analiz

Çalışmanın planlama aşamasında Power analizi yapılarak minimum hasta sayısı belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile yapılmıştır. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren nümerik değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler medyan (25.-75. persentil) olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenler için Bağımsız gruplar T testi ile, normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için ise Mann Whitney U testi ile test edilmiştir. Ölçümler arası farklılığın araştırılmasında normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler için Friedman iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon Analizi ile belirlenmiştir. İki yönlü hipotezlerin testi için  $p < 0.05$  istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edilmiştir.

### 3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan etik kurul onayı alınmıştır (Tarih:28/11/2018, Sıra no:2018/311). Proje giderlerinin karşılanabilmesi için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne başvurulmuştur. Proje, ilgili birim tarafından onaylanıp yürürlüğe girmiştir (Proje No: 2019/007).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Demografik Veriler ve Laboratuvar Bulguları

Çalışma grubu 7'si kadın (%46,7), 8'si erkek (%53,3) olmak üzere 15 yeni tanı almış tedavi edilmemiş RA hastasından oluşturulmuştur. Hastaların genel yaş ortalaması  $44,8 \pm 11,5$  (25-59 yaş aralığı) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ilaç kullanımı veya bilinen kronik bir hastalığı olmayan 7'si kadın (%50), 7'si erkek (%50) 14 sağlıklı gönüllüden oluşturulmuştur. Kontrol grubunun genel yaş ortalaması  $43,2 \pm 8,5$  (31-58 yaş aralığı) olarak belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grupları hem cinsiyet hem de yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir (sırasıyla  $p=1,000$  ve  $0,678$ ).

Çalışma grubunda yer alan hastaların 7 (%46,7)'si, tedavi sürecine uyum göstermemeleri, gebelik veya mikrobiyotayı etkileyebilecek farklı ilaçlar kullanmaları gibi çeşitli nedenlerle takip aşamasında çalışmadan çıkarılmıştır. Tedaviye uyum gösteren ve düzenli kontrole gelen 8 (%53,3) hastanın 0., 6. ve 9/12. aylarda kontrolleri yapılmıştır. Bu grup içerisinde 3 (%37,5) kadın, 5 (%62,5) erkek hasta yer almıştır. Hastaların 29-59 yaş aralığında olduğu belirlenmiştir.

Hastaların laboratuvar tetkiklerinde yer alan ACPA ve RF sonuçlarına göre, yeni tanı almış 15 hastanın 13'ü (%86,7) seropozitif, 2'si (%13,3) seronegatif RA olarak tanımlanmıştır. Seronegatif RA olarak tanımlanan bir hasta 9/12 ay boyunca takip edilmiştir.

Çalışma için hazırlanmış formda yer alan sorular yardımıyla hastaların beslenme alışkanlıkları hakkında bilgi edinilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, çalışma grubundaki hastaların 2 (%13,3)'si et ağırlıklı, 7 (%46,7)'si sebze ağırlıklı ve 6 (%40)'sı dengeli beslendiğini belirtmiştir. Kontrol grubundaki bireylerin 1 (%7,1)'i et ağırlıklı, 4 (%28,6)'ü sebze ağırlıklı ve 9 (%64,3)'ü dengeli beslendiğini bildirmiştir. İki grubun beslenme alışkanlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p$  değeri  $0,482$ ).

Bireylerin yoğurt, kefir, turşu, tarhana gibi probiyotik içeren gıdaları ne sıklıkla tükettikleri sorgulanmıştır. Çalışma grubundaki bireylerin 4 (%26,7)'ü her gün, 9 (%60)'ü haftada birkaç gün, 2 (%13,3)'si ayda birkaç gün bu tür gıdalar tükettiğini belirtmiştir.

Kontrol grubundaki bireylerin ise 7 (%50)'si her gün, 7 (%50)'si haftada birkaç gün tükettiğini bildirmiştir. İki grup arasında probiyotik içeren gıda tüketim sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p$  değeri 0,281).

Hastalığın etiyojisinde yer aldığı bilinen bir faktör olan sigaranın gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği bulunmuştur ( $p$  değeri 0,215). Çalışma grubundaki hastaların 6 (%40)'sı, kontrol grubundaki bireylerin 2 (%14,2)'si sigara kullandığını belirtmiştir. Hastalara ve sağlıklı kontrollere ait demografik veriler 12.Çizelge'de gösterilmiştir.

12.Çizelge. Yeni tanı RA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait demografik veriler.

	<b>Yeni Tanı RA (n=15)</b>	<b>Sağlıklı Kontrol (n=14)</b>	<b><math>p</math> değeri</b>
<b>Cinsiyet (E/K)</b>	8/7	7/7	1,000
<b>Yaş ortalaması</b>	44,8	43,2	0,678
<b>Beslenme<sup>1</sup></b>	2/7/6	1/4/9	0,482
<b>Probiyotik tüketimi<sup>2</sup></b>	4/9/2	7/7/-	0,281
<b>Sigara kullanımı</b>	6	2	0,215

<sup>1</sup>Beslenme alışkanlıkları et ağırlıklı, sebze ağırlıklı ve dengeli olarak sıralanmıştır.

<sup>2</sup>Probiyotik tüketim sıklığı her gün, haftada birkaç kez, ayda birkaç kez olacak şekilde sıralanmıştır.

#### **4.2. Takip Edilen Hastaların Takip Sürecindeki Tedavi ve Hastalık Aktivitesi Değişimleri**

Takibi yapılabilen tüm hastaların tedavileri, başlangıçta ve takiplerde, en az bir DMARD (temel olarak MTX) içerecek şekilde düzenlenmiştir. Takip edilen sekiz hastanın başlangıçta ve devam eden süreçte kullandıkları ilaçlar 13.Çizelge'de gösterilmiştir.

13.Çizelge. Takip edilen hastaların takip sürecindeki tedavileri.

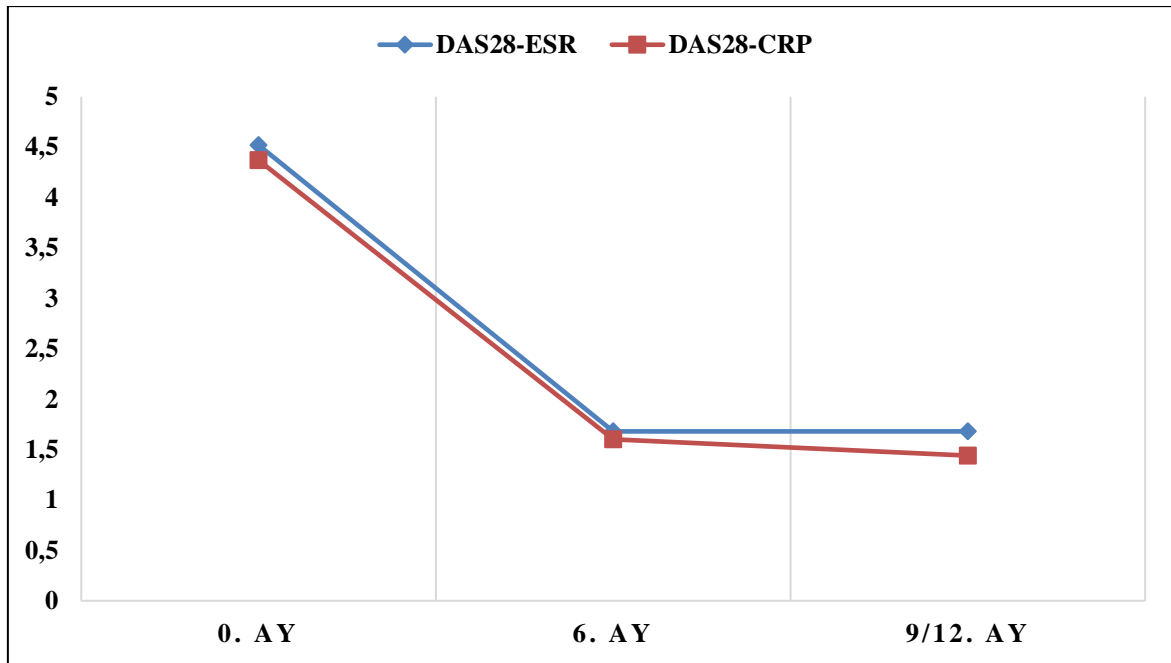
HASTA	0. ay	6. ay	9/12. ay
1	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon
2	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon
3	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon Hidroksiklorokin	Metotreksat Metilprednizolon Hidroksiklorokin
4	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon
5	Metotreksat Metilprednizolon Hidroksiklorokin	Metotreksat Metilprednizolon Hidroksiklorokin	Metotreksat Metilprednizolon Hidroksiklorokin
6	Metotreksat Metilprednizolon Hidroksiklorokin	Metotreksat Metilprednizolon Hidroksiklorokin	Metotreksat Metilprednizolon
7	Metotreksat	Metotreksat	Metotreksat
8	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon	Metotreksat Metilprednizolon

Takip edilen hastaların hastalık aktivite skorları değerlendirildiğinde, 6. ay kontrollerinde büyük çoğunluğunun (7 hastanın), 9/12. ay kontrollerinde ise tümünün düşük aktiviteli veya remisyonda olduğu belirlenmiştir. Başlangıç değerleri ile 6. ay ve 9/12. ay değerleri karşılaştırıldığında hem DAS-ESR hem de DAS-CRP ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Hastaların DAS28-ESR ve DAS28-CRP sonuçlarının aylara göre ortanca değerleri ve karşılaştırmaları 14.Çizelge ve 6.Çizim’de gösterilmiştir.



14.Çizelge. Takip edilen hastaların aylara göre DAS-ESR ve DAS-CRP ortanca değerleri ve karşılaştırmaları.

n=8	DAS28-ESR	DAS28-CRP	n=8	DAS28-ESR <i>p</i> değeri	DAS28-CRP <i>p</i> değeri
0. ay	4,52	4,37	0.ay-6.ay	0,008	0,026
6. ay	1,68	1,6	0.ay-9/12.ay	0,008	0,002
9/12. ay	1,68	1,44	6.ay-9/12.ay	1,000	1,000



6.Çizim. Takip edilen hastaların aylara göre DAS-ESR ve DAS-CRP değişimleri.

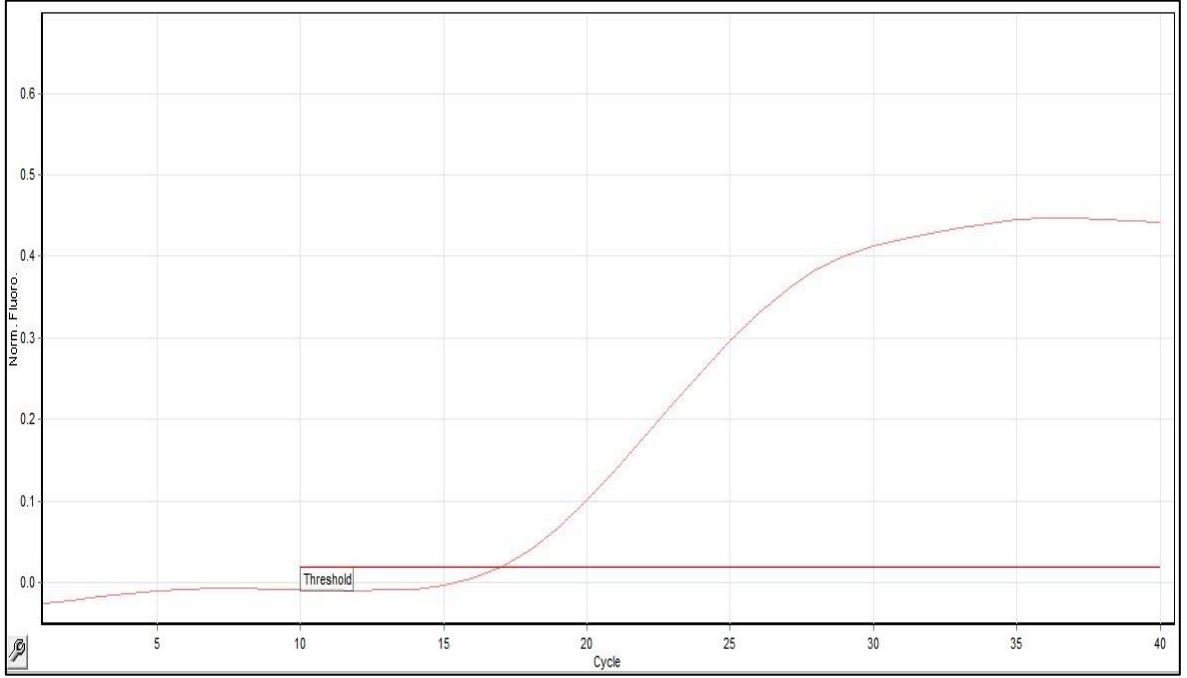
#### 4.3. İzole edilen DNA'ların Değerlendirilmesi

QIAamp PowerFecal Pro DNA kit ile izole edilen tüm örneklerden PZR için uygun DNA miktarı elde edilebilmiştir. Spektrofotometre ile ölçüldüğünde DNA miktarları 130,05-1337,51 ng/μl aralığında saptanmıştır. Elde edilen DNA'nın saflığı için 260/280 oranı değerlendirilmiştir. Tüm örneklerin 260/280 değeri 1,80-1,90 aralığında bulunmuştur.

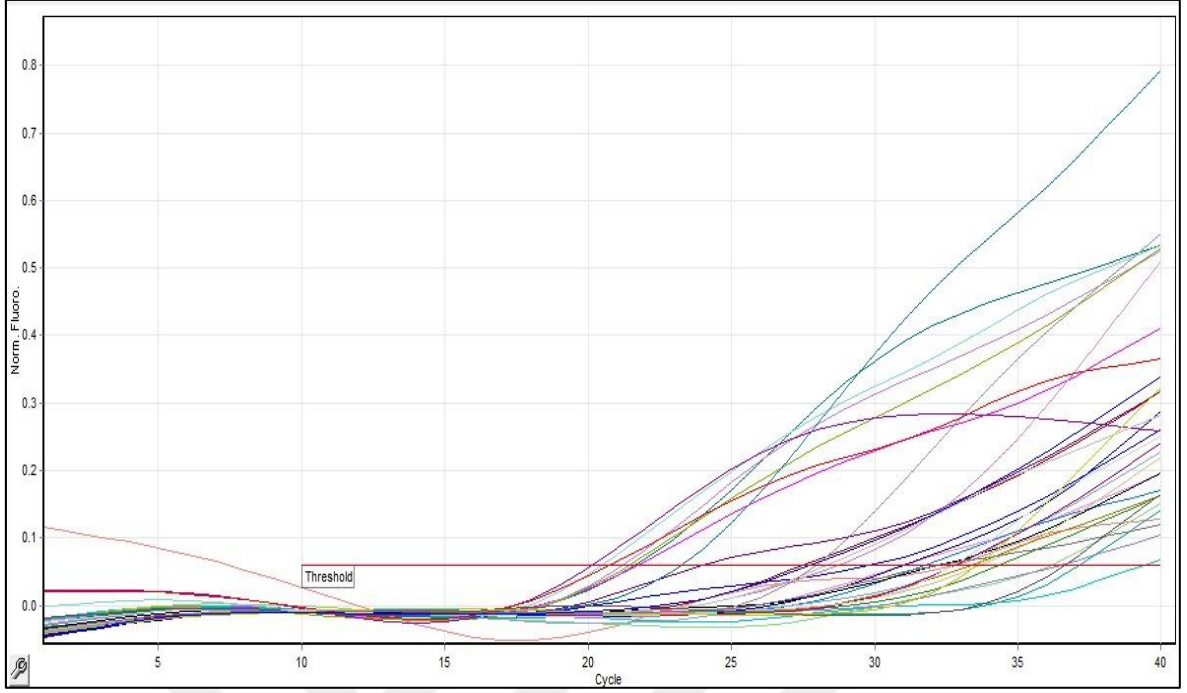
#### 4.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR sonuçları

##### 4.4.1. Hasta Örneklerinin Değerlendirilmesi

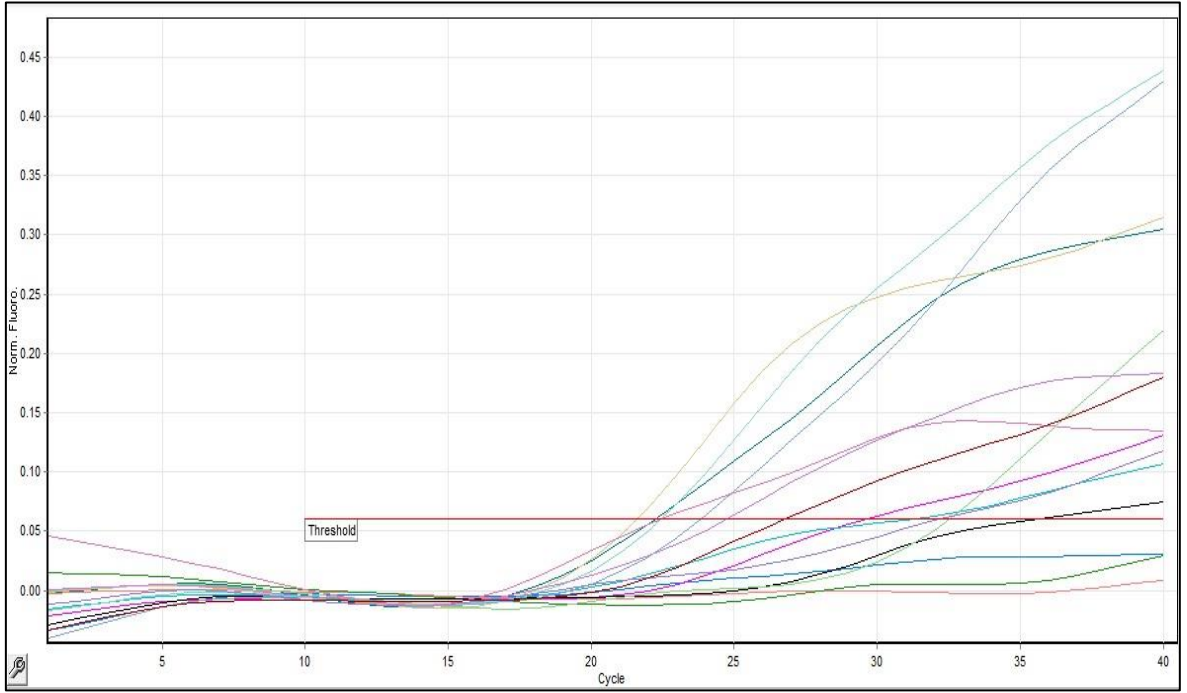
Hastalara ve sağlıklı kontrollere ait kGZ-PZR amplifikasyon eğrilerinden elde edilen CT değerleriyle bakteri kopya sayıları belirlenmiştir. Örnek olarak bazı amplifikasyon eğrileri aşağıda gösterilmiştir.



7.Çizim. Örnek amplifikasyon eğrisi (*B.fragilis*).



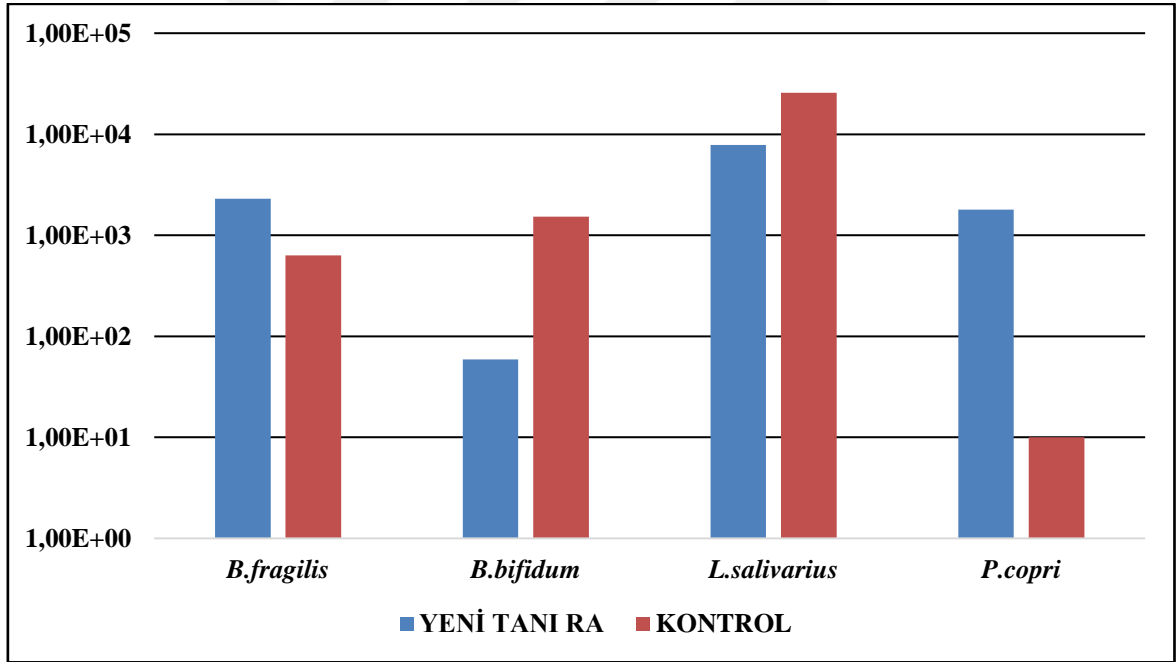
8.Çizim. Çalışma boyunca RA hastalarından alınan tüm örneklere ait amplifikasyon eğrileri (*B.bifidum*).



9.Çizim. Sağlıklı kontrollerin amplifikasyon eğrileri (*B.bifidum*).

#### 4.4.2. Yeni Tanı RA'ların ve Sağlıklı Kontrollerin Bakteri Kopya Sayılarının Karşılaştırılması

Çalışma grubunda yer alan yeni tanı almış ve tedavi edilmemiş 15 RA hastası ile kontrol grubunda yer alan 14 sağlıklı kontrolün bakteri kopya sayıları karşılaştırılmıştır. Yeni tanı almış RA hastalarında *P.copri*'nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlenmiştir ( $p=0,046$ ). Sağlıklı bireylerde ise *L.salivarius* anlamlı olarak daha fazla saptanmıştır ( $p=0,047$ ). *B.fragilis*'in ve *B.bifidum*'un kopya sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamakla birlikte *B.fragilis*'in RA hastalarında yaklaşık 4 kat, *B.bifidum*'un ise kontrol grubunda yaklaşık 25 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her iki grubun 200 ng DNA'da belirlenen bakteri kopya sayılarına ait veriler 10.Çizim ve 15.Çizelge'de gösterilmiştir.



10.Çizim. Yeni tanı RA'ların ve sağlıklı kontrollerin bakteri kopya sayılarının ortanca değerleri.

15.Çizelge. Yeni tanı RA'ların ve sağlıklı kontrollerin bakteri kopya sayılarının ortanca değerleri.

	YENİ TANI RA (n=15)	KONTROL (n=14)	p değeri
<i>B.fragilis</i>	2304	631	0,217
<i>B.bifidum</i>	59	1523	0,270
<i>L.salivarius</i>	7824	25811	<b>0,047</b>
<i>P.copri</i>	1788	10	<b>0,046</b>

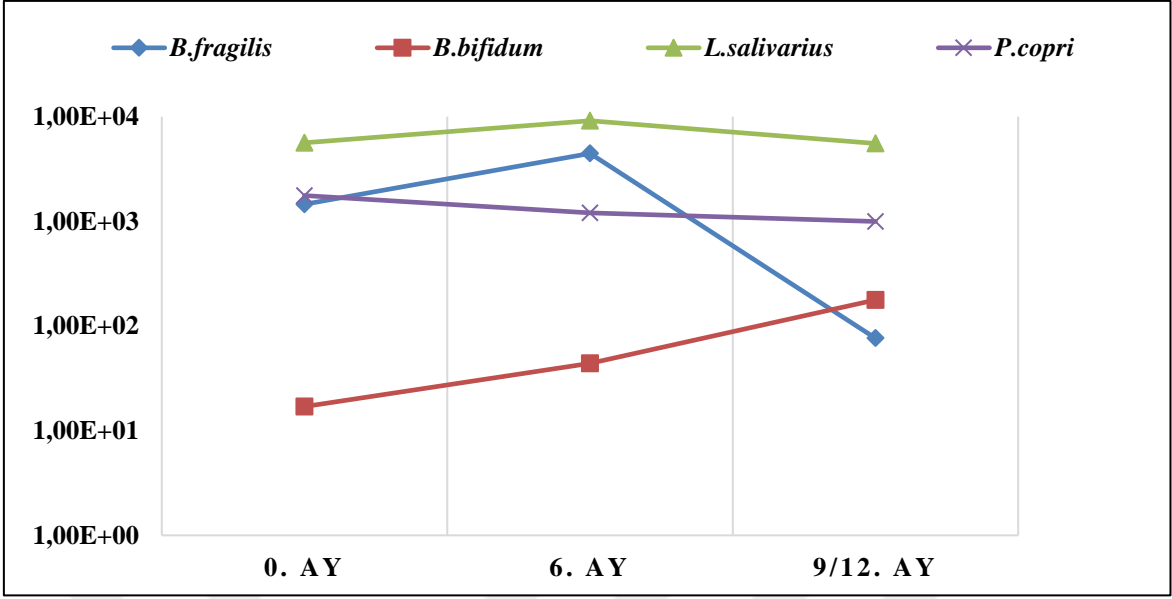
#### 4.4.3. RA Hastalarının Tedavi Takiplerindeki Bakteri Değişimleri

Tedavi takibi yapılan hastaların 0., 6. ve 9/12. aylardaki bakteri kopya sayılarının ortanca değerleri karşılaştırılmıştır. Dört bakteri için de istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Hastaların aylara göre bakteri değişimleri 16.Çizelge ve 11.Çizim'de gösterilmiştir.

*B.fragilis*'in 0. aydaki ortanca değerinin 1453,5 olduğu, bu değerin 6. ayda yaklaşık 3 kat arttığı belirlenmiştir. Son kontrolde alınan örneklerde ortanca değer 76,5'e kadar düşmüştür. *L.salivarius* da *B.fragilis* gibi değişken bir grafik sergilemiş olup, en yüksek değerler 6. ayda saptanmıştır. *B.bifidum* 0. ayda en düşük düzeyde bulunmuştur. Takiplerde bakteri sayısının giderek arttığı, son kontrolde yaklaşık 10 kat kadar yükseldiği belirlenmiştir. Aksine, *P.copri*'nin en yüksek kopya sayısı 0. ayda saptanmıştır. Sonrasında ise bakteri sayısı giderek azalan bir grafik sergilemiştir. Son kontrolde alınan örneklerdeki bakteri kopya sayısının başlangıç değerine kıyasla yaklaşık yarı yarıya azaldığı belirlenmiştir.

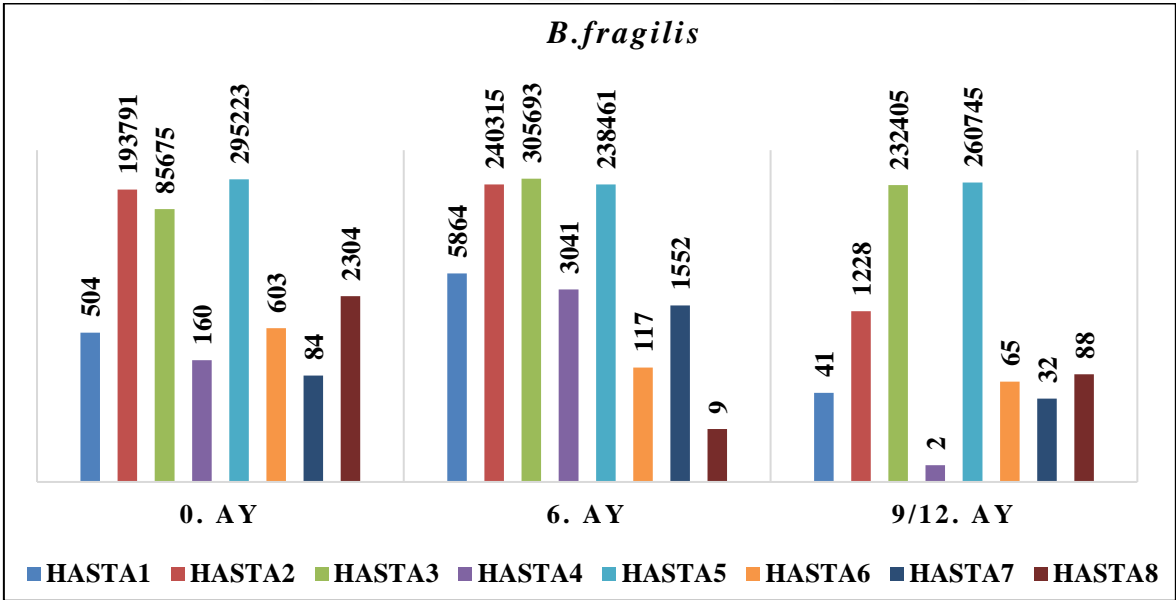
16.Çizelge. Takip edilen RA hastalarının tedavi takiplerindeki bakteri kopya sayılarının ortanca değerleri.

n=8	0. ay	6. ay	9/12. ay	p değeri
<i>B.fragilis</i>	1453,5	4452,5	76,5	0,093
<i>B.bifidum</i>	17	44	177,5	0,368
<i>L.salivarius</i>	5620	9137	5543,5	0,417
<i>P.copri</i>	1763,5	1208	996,5	0,687



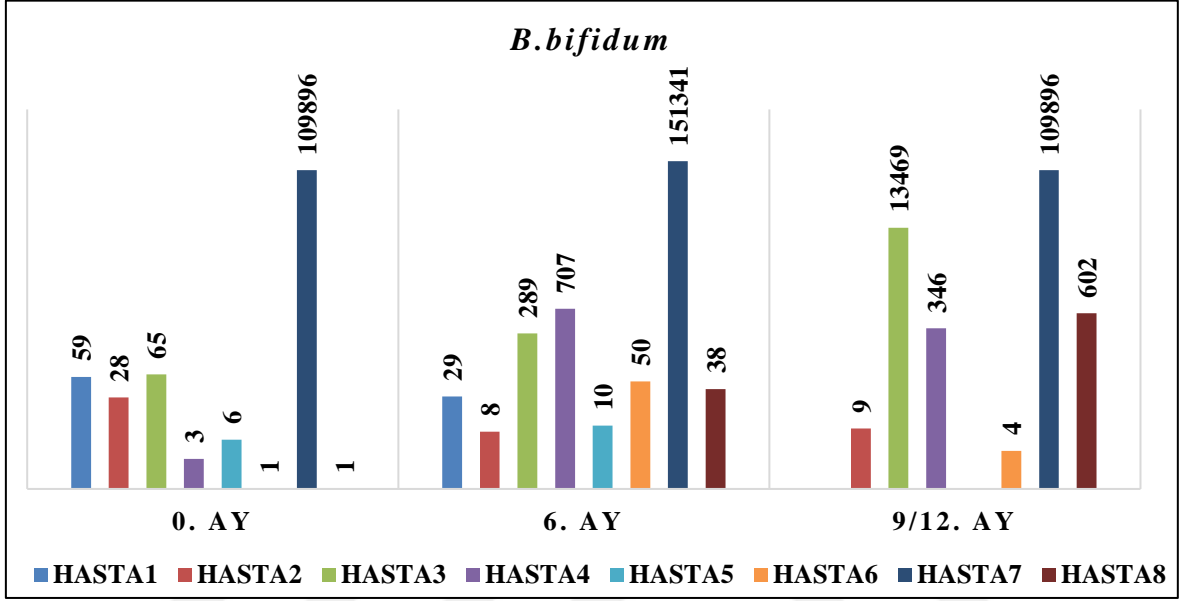
11.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre bakteriyel değişimleri.

*B.fragilis* kopya sayılarındaki değişimin gösterildiği 12.Çizim incelendiğinde, 5, 6 ve 8 numaralı hastalarda en yüksek kopya sayısı 0. ayda saptanmakla beraber, hastaların büyük çoğunluğunun 6. ayda en yüksek bakteri kopya sayısına sahip olduğu belirlenmiştir.



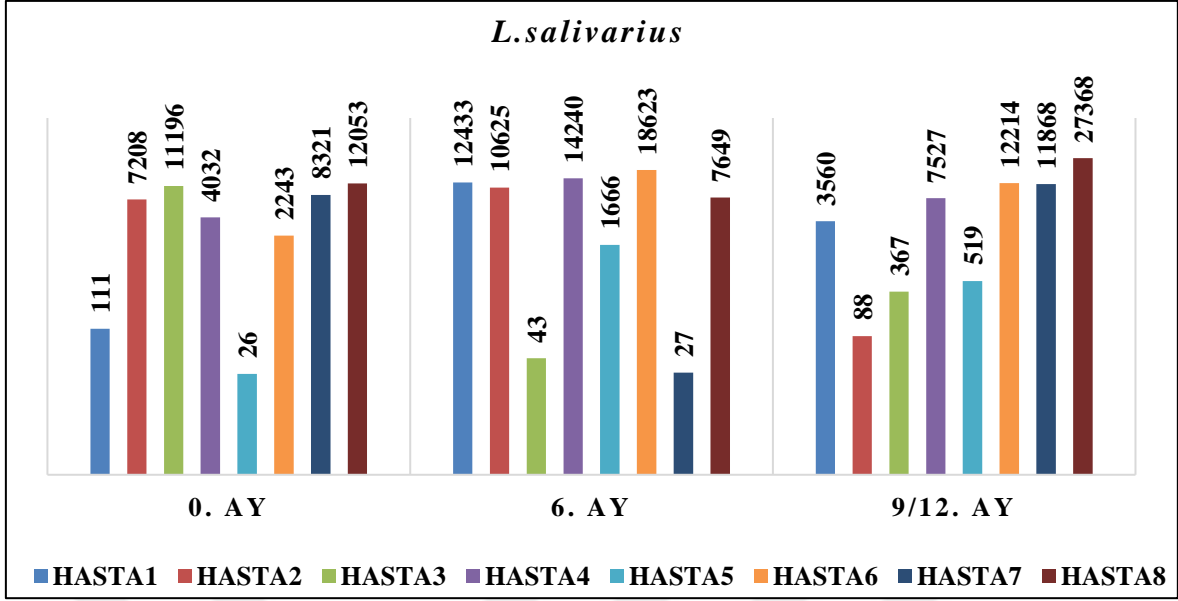
12.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre *B.fragilis* kopya sayılarındaki değişimler.

*B.bifidum*'un aylara göre kopya sayıları değerlendirildiğinde, 7 numaralı hastanın bakteri kopya sayısının diğer hastalara kıyasla oldukça yüksek olduğu ve bu hastanın kopya sayılarında aylara göre belirgin bir değişim olmadığı görülmüştür. En yüksek kopya sayısı 1 ve 2 numaralı hastalarda 0. ayda saptanırken, tam tersi şekilde 3 ve 8 numaralı hastalarda bakteri kopya sayısı tedavi sürecinde artış göstermiştir (13.Çizim).



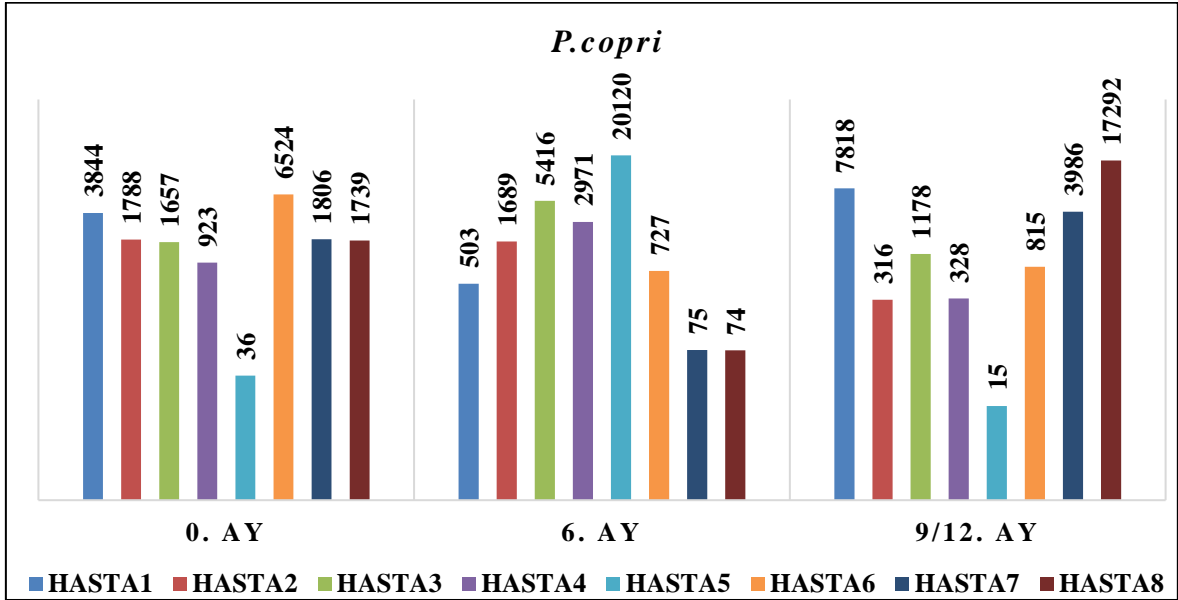
13.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre *B.bifidum* kopya sayılarındaki değişimler.

Test edilen diğer bakterilerle karşılaştırıldığında, *L.salivarius*'un tüm hastalarda genel olarak en yüksek kopya sayısına sahip tür olduğu belirlenmiştir. İki ve 3 numaralı hastalarda bakteri kopya sayıları tedavi sürecinde azalma göstermiştir (14.Çizim).



14.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre *L.salivarius* kopya sayılarındaki değişimler.

Hastaların *P.copri* kopya sayıları incelendiğinde, 6. ayda 3, 4, 5 numaralı hastaların en yüksek kopya sayılarına, 7 ve 8 numaralı hastaların ise en düşük kopya sayılarına sahip olduğu görülmüştür (15.Çizim).



15.Çizim. Takip edilen RA hastalarının aylara göre *P.copri* kopya sayılarındaki değişimler.



#### 4.4.4. DAS28 ile Bakteri Kopya Sayılarının Korelasyonu

Takip edilen hastaların 0., 6. ve 9/12. aylardaki bakteri kopya sayıları ile DAS28 düzeyleri arasında korelasyon olup olmadığı araştırılmış olup, her iki skorlama yöntemi ile bakteri kopya sayıları arasında korelasyon belirlenmemiştir. DAS28 ile test edilen bakteriler arasındaki korelasyon testinin  $p$  değerleri 17.Çizelge’de gösterilmiştir.

17.Çizelge. DAS28 ve test edilen bakteriler arasındaki korelasyon testine ait  $p$  değerleri.

n=8	<i>B.fragilis</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>L.salivarius</i>	<i>P.copri</i>
DAS-ESR	0,156	0,329	0,200	0,180
DAS-CRP	0,087	0,377	0,466	0,322

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde genetik ve çevresel faktörlerin yanı sıra, mikrobiyotanın da RA etiyojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.<sup>8</sup> Bu konuda yapılan çalışmalar, RA hastaları ve sağlıklı bireylerin bağırsak mikrobiyotaları arasında farklılık olduğunu göstermiştir.<sup>11</sup> Zaragoza-García ve ark.<sup>75</sup>'nin yaptıkları metaanalizde RA'nın mikrobiyota ile ilişkisini inceleyen 27 adet basılı yayın olduğu bildirmiştir. Bu çalışmalardan bazılarında, RA tedavisinde kullanılan MTX, etanersept gibi DMARD'lar ile RA hastalarındaki disbiyozisin tersine döndürülebileceği bildirilmiştir.<sup>10,14</sup> Bu çalışmalarda yöntem olarak genellikle belirli tedavileri alan hastalarla, farklı tedavi alan hastalar veya sağlıklı bireylerin mikrobiyotaları karşılaştırılmıştır. Literatür taramasından edinilen bilgilere göre, tedavinin bağırsak mikrobiyotasına olan etkilerini incelemek amacıyla hasta takibinin yapıldığı kohort çalışmaların sayısı birkaç tanedir.<sup>75</sup> Bu çalışma dünya genelinde RA hastalarının tedavi takibi yapılarak mikrobiyal değişimlerinin incelendiği nadir çalışmalardan biridir. Ülkemizde ise bu konu ile ilgili yapılmış bir çalışma olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı, RA ile ilişkilendirilmiş referans bakteriler kullanılarak, yeni tanı almış tedavi edilmemiş hastalarla sağlıklı kontrollerin bağırsak mikrobiyotalarını karşılaştırmak ve tedavi takibi yapılan hastalarda tedavinin mikrobiyota üzerine etkisini araştırmaktır. Bu amaçla *B.fragilis*, *P.copri*, *B.bifidum* ve *L.salivarius* türlerindeki bakteri kopya sayılarındaki değişimler kGZ-PZR yöntemiyle incelenmiştir.

Mikrobiyotanın şekillenmesinde doğum şekli, yaş, beslenme, kullanılan ilaçlar gibi birçok faktörün rol oynadığı bilinmektedir.<sup>2,22</sup> Yetişkinlik döneminde mikrobiyal çeşitliliğin ve zenginliğin oluşmasında en etkili faktör ise diyetdir.<sup>2</sup> Bu nedenle çalışmada yeni tanı almış RA hastalarının ve kontrol grubundaki bireylerin demografik verileri birbirine benzer özellikte seçilmiştir. Bu şekilde mikrobiyatada değişikliğe neden olan yaş, cinsiyet, beslenme alışkanlıkları ve sigara kullanımı gibi çeşitli faktörlerin etkileri azaltılmaya çalışılmıştır. Yapılan istatistiksel analizde demografik verilerin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir. Örnek sayısının istatistiksel veri oluşturacak kadar yeterli olmaması nedeniyle kadın-erkek arasındaki mikrobiyal farklılıklar değerlendirilmemiştir. Aynı şekilde takip edilen hastaların büyük çoğunluğunun

seropozitif olması nedeniyle otoantikorlara bağılı oluşabilecek mikrobiyal farklılıklar karşılaştırılmamıştır.

Romatoid artritte nihai terapötik hedef hastaların remisyona girmesini sağlamaktır. Gelişmiş tedavi stratejileri sayesinde, erken RA'lı hastalarda %80'e kadar klinik remisyona sağlanabilmektedir. Tedavi etkinliğini değerlendirmek amacıyla, hastaların klinik ve laboratuvar verilerinin kullanıldığı, çeşitli hastalık aktivite skorları kullanılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan skor DAS28'dir.<sup>82</sup> Bu çalışmada da tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde DAS28 kullanılmıştır. DAS28 hem ESR hem CRP kullanılarak hesaplanmıştır. Her iki skorda da hastalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Tedavi başlangıcında DAS28 ortanca değerleri, ESR ve CRP için sırasıyla 4,52 ve 4,37 olarak belirlenmiştir. Yeni tanı almış hastaların büyük çoğunluğunda aktivite düzeyi orta-yüksek olarak saptanmıştır. Altı ay sonra yapılan kontrollerde ise DAS28 ortanca değerleri sırasıyla 1,68 ve 1,60 olarak hesaplanmış ve hastaların büyük çoğunluğunun düşük aktiviteli veya remisyonda olduğu belirlenmiştir. Sadece 1 hastanın 6. ay kontrolünde orta/yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Son takip sürecinde ise tüm hastaların DAS28'e göre remisyonda olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler uygulanan tedavi stratejilerinin etkin olduğunu göstermektedir.

Bağırsak mikrobiyotasının en önemli üyelerinden biri olan *B.fragilis*, Treg hücreler aracılığıyla immün sistemin dengelemesinde büyük rol oynamaktadır.<sup>69</sup> Bakterinin RA ile ilişkisini araştıran çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir.<sup>10,61</sup> Vaahtovu ve ark.<sup>61</sup>, RA hastalarında kontrollere kıyasla *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* grubunun ve *B.fragilis* alt grubunun önemli ölçüde azaldığını saptamışlardır. *B.fragilis* hakkında tür düzeyinde bilgi sağlayan çok fazla çalışma olmamakla birlikte, Rodrigues ve ark.<sup>10</sup>, RA hastalarında *Bacteroides* ve *Prevotella* cinslerinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *B.fragilis* kopya sayısının ortanca değerleri yeni tanı RA hastalarında 2304, sağlıklı kontrollerde ise 603 olarak saptanmıştır. Hastalardaki değer kontrol grubundan yaklaşık dört kat kadar fazla olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p$  değeri 0,217). Bu çalışmada hasta grubunda bakteri kopya sayısının daha yüksek olması, immüniteyi düzenleyici rolünün aksine Stewart ve ark.<sup>69</sup>'nın da bildirdiği gibi *B.fragilis*'in antijenik taklit yeteneğiyle otoimmüniteyi tetiklemiş olabileceğini düşündürmüştür.

*B.bifidum* bağırsak mikrobiyotasında yaygın bulunan probiyotik bir bakteridir.<sup>72</sup> Çeşitli çalışmalarda *B.bifidum*'un artrit oluşumuna karşı koruyucu olduğu ve tedavi amacıyla kullanılabilceği bildirilmiştir.<sup>53,73</sup> Bu çalışmada da sağlıklı kişilerde *B.bifidum*'un kopya sayısının daha fazla olduğu saptanmıştır. *B.bifidum* kopya sayısının ortanca değerleri yeni tanı RA hastalarında 59, sağlıklı kontrollerde 1523 olarak belirlenmiştir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememesine rağmen, sağlıklı bireylerdeki bakteri sayısının yaklaşık 25 kat fazla olduğu saptanmıştır. Bildirilen çalışmaların aksine, T hücre aracılı otoimmün artrit oluşumuna yatkın mikropsuz farelerle yapılan bir çalışmada, mikropsuz ortamda büyütülen farelerde hastalık oluşmamasına rağmen tek başına *B.bifidum* ile kolonize edildiğinde hızla artrit geliştiği bildirilmiştir.<sup>74</sup> Bu modelde *B.bifidum*'un Treg ve T<sub>H</sub>17 arasındaki dengenin bozulmasında ve TLR2-TLR4 aracılı artrit oluşmasında rol oynadığı düşünülmüştür.<sup>83</sup> Bununla birlikte farklı bir mikrobiyota üyesiyle monokolonizasyonun benzer şekilde artrit gelişimine yol açıp açmayacağı bilinmemektedir. Abdollahi-Roodsaz ve ark.<sup>74</sup>'nın çalışmasında *B.bifidum*'un artriti gerçekten tetikleyen bir faktör olup olmadığı gösterilemediği için, farklı çalışmalardan ve çalışmamızdan elde edilen veriler değerlendirildiğinde *B.bifidum*'un artrite karşı koruyucu rolünün olduğu düşünülmüştür.

Laktobasiller yararlı etkileri olduğu bilinen probiyotik bakteriler içerisinde yer almaktadırlar.<sup>33</sup> Yapılan bir hayvan deneyinde, RA hastalarından elde edilmiş *L.salivarius*'un oral yoldan farelere uygulanması, farelerde hem Treg hücrelerinin hem de IL-10 seviyelerinin artmasını ve artrit şiddetinin azalmasını sağlamıştır.<sup>76</sup> Yararlı etkilerinin aksine, bazı çalışmalar RA hastalarında laktobasillerin arttığını göstermiştir.<sup>15,62</sup> Liu ve ark.<sup>62</sup>, erken RA hastalarında sağlıklı kontrollere göre *Lactobacillus* cinsinin önemli derecede arttığını saptamışlardır. Zhang ve ark.<sup>15</sup>, RA'lı hastalarının ağız ve bağırsak mikrobiyotalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *L.salivarius* türünün fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *L.salivarius* kopya sayısının ortanca değerleri yeni tanı RA hastalarında 7824, sağlıklı kontrollerde ise 25811 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlenmiştir (*p* değeri 0,047). Bu çalışmanın verileri *L.salivarius*'un insan sağlığını olumlu etkilediğini düşündürmüştür. Ayrıca, çalışmanın sonuçlarına göre, araştırılan bakteriler arasında en bol bulunan bakteri *L.salivarius*'tur. Bu durumun Türk toplumunda yoğurt, tarhana gibi probiyotik özellikteki gıdaların sıklıkla tüketiliyor olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Toplumların

beslenme alışkanlıklarının farklılık göstermesi gibi mikrobiyotayı etkileyebilecek birçok faktörün olması, çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle *L.salivarius*'un RA ile gerçekten ilişkili olup olmadığını anlamak için farklı coğrafik bölgelerde ve topluluklarda da araştırmalar yapılmalıdır.

Günümüzde yeni tanı almış RA hastalarında *P.copri*'nin daha bol bulunduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır.<sup>11</sup> Bu çalışmalara ek olarak, Pianta ve ark.<sup>78</sup>, *P.copri*'nin yeni tanı almış RA hastalarında sadece bulunmadığını aynı zamanda immün reaksiyonları tetiklediğini de göstermişlerdir. Çalışmamızda *P.copri* kopya sayısı ortanca değerleri RA hastalarında 1788, sağlıklı kontrollerde 10 olarak saptanmıştır. Bu değerler istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (*p* değeri 0,046). Elde edilen bu bulgu diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir ve *P.copri*'nin yeni tanı RA ile gerçekten ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Hasta ve kontrol grubunun karşılaştırıldığı verilerin tümü değerlendirildiğinde; *P.copri*'de ve *L.salivarius*'da istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmıştır. *B.fragilis*'de ve *B.bifidum*'daki farkın ise anlamlı olmadığı bulunmuştur. Buna rağmen bu bakterilerin kopya sayılarında sırasıyla yaklaşık 4 ve 25 kat fark olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular bu açıdan değerlendirildiğinde, özellikle çalışmada yer alan iki probiyotik bakterinin de yeni tanı RA hastalarında düşük saptanmış olması probiyotik bakterilerin artrit oluşumuna karşı koruyucu etkiler gösterebileceğini düşündürmüştür.

Metotreksat, anti-kanser ve immünosupresif ajan olarak yaygın kullanılan bir ilaçtır.<sup>84</sup> RA tedavisinde kullanılan sentetik DMARD'lar içerisinde ilk tercih edilendir.<sup>7</sup> DMARD alan RA hastalarının mikrobiyotaya etkilerinin araştırıldığı fazla sayıda çalışma bulunmamakla beraber, yapılan çalışmalarda sağlıklı kontrollere kıyasla tedavi almış RA hastalarında mikrobiyal farklılıklar olduğu gösterilmiştir.<sup>10,14,15</sup> Ayrıca, Zhang ve ark.<sup>15</sup>, MTX tedavisinin mikrobiyota bileşimini etkileyebileceğini ve kısmen hastalıkla ilişkili disbiyozisin düzeltebileceğini bildirmişlerdir. Metotreksat tedavisine bağlı oluşan mukozal yan etkilerin araştırıldığı bir hayvan deneyinde de tedavinin farelerdeki mikrobiyal popülasyonu ve çeşitliliği belirgin derecede değiştirdiği saptanmıştır. En belirgin değişimin *Bacteroidales* ailesinde olduğu, bu aile içerisinde yer alan *B.fragilis*'in önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, sonda ile farelerin intestinal sistemine *B.fragilis* verilmesinin, MTX'in indüklediği inflamatuvar yan etkileri iyileştirdiği gözlenmiştir.<sup>84</sup>

Çalışmamızda tedavi takibi yapılan 8 hastanın tümüne kesintisiz MTX tedavisi uygulanmış olup, test edilen bakterilerin kopya sayılarında değişiklik olmakla beraber kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir.

Yapılan literatür taramasında, MTX tedavisinin *B.fragilis* üzerine olan etkisini gösteren tek bir çalışma olduğu belirlenmiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi, bu hayvan deneyinde MTX tedavisi *B.fragilis* miktarını önemli ölçüde azaltmıştır.<sup>84</sup> Benzer şekilde çalışmamızdaki sekiz hastanın üçünde en yüksek kopya sayıları tedaviden önce saptanmış ve tedavi sırasında bakteri sayısında kısmen azalma görülmüştür. Takip edilen hastaların tüm verileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların anlamlı olmadığı belirlenmiştir ( $p$  değeri 0,093). *B.fragilis* kopya sayılarının ortanca değeri en yüksek 6. ayda saptanırken, 9/12. ayda dramatik bir şekilde düştüğü görülmüştür. Sonuç olarak; Zhou ve ark.<sup>84</sup>'nın çalışmasıyla uyumlu olarak uzun süreli MTX tedavisinin *B.fragilis* kopya sayısında azalmaya neden olabileceği düşünülmüştür.

Son yıllarda deney hayvanlarında oluşturulan artrit modelleriyle yapılan çalışmalarda, probiyotik takviyenin hastalığın iyileşmesinde yararlı etkiler gösterdiği belirlenmiştir.<sup>36</sup> DMARD tedavisine ek olarak terapötik amaçlı *B.bifidum* ve bazı laktobasil türlerinin RA hastalarına 2 ay süreyle verildiği bir çalışmada, probiyotiklerin DAS28 ve CRP seviyelerinde düzelmeye sağladığı gösterilmiştir.<sup>85</sup> Literatür taramasında, *B.bifidum*'un miktarında uzun süreli tedavi takibine bağlı değişimini gösteren bir çalışma bulunamamıştır. Çalışmamızdan edinilen bilgiler de *B.bifidum*'un RA için koruyucu olduğunu düşündürmüştür. Hastaların tedavi takibi sürecindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ( $p$  değeri 0,368), *B.bifidum*'un başlangıç kopya sayısına göre tedavinin 9/12. ayında yaklaşık 10 kat artarak kontrol grubuna yaklaştığı belirlenmiştir. Elde edilen bu fark uygulanan tedavilerin mikrobiyotayı kısmen düzeltmiş olabileceğini düşündürmüştür. Özellikle 3 ve 8 numaralı hastalarda bu durum belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Sonuç olarak; *B.bifidum*'un tedavi başarısını gösteren bir belirteç olabileceği ve terapötik amaçlı kullanılabileceği düşünülmüştür.

Laktobasiller immün fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve bağırsak bariyerinin oluşmasında görev alan önemli probiyotik bakterilerdir.<sup>53</sup> Yapılan bir metaanalizde RA hastalarına terapötik amaçlı probiyotik verilmesi, hastaların DAS28 düzeylerinde belirgin bir değişim oluşturmamakla beraber CRP düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu

nedenle, probiyotiklerin RA tedavisinde, sınırlı da olsa, iyileşmeye katkı sağlayabileceği bildirilmiştir.<sup>36</sup> Çalışmamızda *L.salivarius*'un sağlıklı kişilerde daha fazla bulunduğu saptanmıştır. Takip edilen hastaların takip sürecinde elde edilen verilerde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p$  değeri 0,417). Bazı hastaların kopya sayıları tedavi sırasında kısmen artarken, bazılarında azalma görülmüştür. RA'lı hastaların uzun süreli tedavi takibinin *L.salivarius*'a etkisinin araştırıldığı literatür bilgisine rastlanmadığı için çalışma bulguları karşılaştırılmamıştır. Bu nedenle RA tedavisinin probiyotikler ile ilişkisinin daha ayrıntılı araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

*P.copri*, sağlıklı kontrollere göre RA hastalarının mikrobiyotasında daha fazla bulunan ve hastalık patogenezinde rol oynama potansiyeli olan bir bakteridir.<sup>67,78</sup> Yukarıda belirtildiği gibi bu çalışmada da benzer şekilde yeni tanı alan RA hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla *P.copri* istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur. Yapılan literatür taramasında ise uygulanan tedavilerin bakteri miktarını ne yönde değiştirdiği hakkında bilgiye ulaşılamamıştır. Çalışmamızda takip edilen hastaların aylara göre *P.copri* kopya sayılarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p$  değeri 0,687). Buna rağmen başlangıçtaki değerlerin tedavi sürecinde yaklaşık %50 oranında azaldığı görülmüştür. Scher ve ark.<sup>38</sup>, *P.copri* sayısının hastalık süresi ortalama 72 ay olan kronik RA hastalarında sağlıklı kontrollere yaklaşacak kadar azaldığını bildirmişlerdir. RA kronik, hayat boyu devam eden bir hastalık olması nedeniyle *P.copri*'de anlamlı bir değişimin meydana gelebilmesi için daha uzun süreli tedavi takibi yapılması gerekebilir. Ayrıca hastalık aktivitesini belirlemede kullanılan skorlar her zaman hastalığın prognozunu yeterince gösteremeyebilir.<sup>82</sup> “Sessiz ilerleme” olarak adlandırılan bu gibi durumlarda bakteri sayısındaki azalmanın gösterilmesinin, tedavi başarısının belirlenmesinde yardımcı olabilecek bir belirteç olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür.

Tedavi takibi gerektiren prospektif çalışmalar zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu tür çalışmalar hasta katılımı ve uyumu ile gerçekleştirilebildiğinden, elde edilen veriler oldukça değerlidir. Bu çalışmaya yeni tanı almış 15 RA hastasıyla başlanmasına rağmen, sekiz hastanın tam takibi yapılabilmektedir. Bununla birlikte, bu çalışma RA hastalarında tedavi takibinin yapıldığı ve bu sürecin RA ile ilişkili bakteriler üzerinden mikrobiyotaya etkilerinin incelendiği nadir çalışmalardan biridir. Elde edilen verilerin ileride yapılacak çalışmalara öncülük edeceği düşünülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Günümüzde RA'da intestinal mikrobiyota kompozisyonunun değiştiğini ve çeşitliliğinin azaldığını gösterilen birçok çalışma bulunmaktadır. Fakat tedaviye bağlı olarak mikrobiyotanın değişimini gösteren çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada RA ile ilişkisi belirlenmiş bakteriler aracılığıyla, yeni tanı almış tedavi edilmemiş hastaların tedavi sürecindeki mikrobiyal değişimleri araştırılmıştır. Bu yönüyle çalışma dünya genelinde nadir yapılmış çalışmalardan biri olması ve ülkemizde de ilk kez yapılmış olması nedeniyle önem taşımaktadır.
2. Özellikle yeni tanı almış RA hastalarında *P.copri*'nin arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bununla birlikte RA ile ilişkili diğer bakteriler hakkında çelişkili yayınlar bulunmaktadır. Çalışmada bağırsak mikrobiyotasının en önemli üyeleri olan ve RA ile ilişkilendirilmiş, *B.fragilis*, *B.bifidum*, *L.salivarius* ve *P.copri* türlerinin sayısal değişimleri kGZ-PZR yöntemiyle araştırılmıştır.
3. Çalışmanın ilk bölümünde, yeni tanı almış RA hastalarının ve sağlıklı bireylerin mikrobiyotaları referans olarak belirlediğimiz bakteriler aracılığıyla karşılaştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak *P.copri* kontrol grubuna kıyasla yeni tanı almış RA hastalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur. *L.salivarius*'un ise sağlıklı bireylerde anlamlı düzeyde fazla olduğu belirlenmiştir. *B.fragilis* ile *B.bifidum*'un kopya sayıları iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemekle birlikte *B.fragilis*'in hasta grubunda 4 kat, *B.bifidum*'un kontrol grubunda 25 kat fazla olduğu saptanmıştır. Probiyotik olduğu bilinen *B.bifidum* ve *L.salivarius* türlerinin kontrol grubunda daha fazla olması, bu türlerin RA hastalığına karşı koruyucu etkili olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte mikrobiyota toplumsal beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak değişiklik gösterebildiğinden, bu bulguların farklı coğrafik bölgelerde ve toplumlarda yapılan çalışmalarda desteklenmesi gerekmektedir.
4. Çalışmanın temel amacı olan diğer bölümünde ise tedavi takibinin referans bakteriler aracılığıyla mikrobiyotaya etkileri araştırılmıştır. Tedavi takibi yapılan



hastaların 0., 6. ve 9/12. aylarda DAS28 düzeyleri ve bakteri kopya sayıları belirlenmiştir. Hastaların tamamında 9/12. ay kontrolünde DAS28 düzeyleri düşmüş ve tedavi başarısı sağlanmıştır. Bakteri kopya sayılarının aylara göre değişimi incelendiğinde, özellikle yeni tanı almış hastalarda fazla olduğu bilinen *P.copri*'nin tedavi sürecinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma göstermemesine rağmen, 9/12. ay sonunda yaklaşık %50 oranında azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç tedavi takibi uzatıldığında bakteri sayısının anlamlı düzeyde azalabileceğini ve tedavi başarısında bir belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür. *B.bifidum*'un kopya sayısı tedavi sürecinde 10 kat artış göstermiş olup, kontrol grubuna yaklaşmıştır. Bu bulgu *B.bifidum*'un da tedavi takibinde bir belirteç olabileceğini veya terapötik amaçlı kullanılabileceğini düşündürmüştür. Tedavi sürecinde diğer bakterilerin kopya sayılarındaki değişimleri hakkında anlamlı bir veri elde edilmemiş ve bu bakterilerin daha fazla araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

5. *P.copri*'nin RA etiolojisinde yer aldığına dair ikna edici kanıtlar olsa da, hala cevaplanmamış birçok soru bulunmaktadır. Bakterinin çoğalmasına neyin yol açtığı henüz bilinmemektedir. Çoğalmanın önlenmesi hastalığın başlamasını engelleyip engellemeyeceği veya terapötik bir seçenek olarak bakterinin ortadan kaldırılmasının kullanılıp kullanılmayacağı hakkında daha fazla çalışma yapılmalıdır.
6. Günümüzde RA tedavisi ile mikrobiyotanın karşılıklı etkileşimine değinen yeterli sayıda çalışma bulunmamakla birlikte, anormal bağırsak mikrobiyotasını sağlıklı hale döndürmek hastalık için potansiyel bir terapötik yaklaşımdır. Bu amaçla RA'da probiyotikler, prebiyotikler veya fekal mikrobiyota transplantasyonu gibi alternatif yöntemler koruyucu veya tedavi edici olarak kullanılabilecektir.
7. Tedavi takibinin amaçlandığı bu çalışmada, yaşanan pandemi süreci ve zaman kısıtlılığı nedeniyle istenilen sayıda hasta takip edilememiştir. Çalışma Power analizine göre uygun sayıda hasta ile gerçekleştirilmiş olsa bile, takip edilen hasta sayısının artırılmasıyla daha tatmin edici sonuçların elde edilebileceği düşünülmüştür.

8. Bu çalışmanın verileri doğrultusunda, gelecekte takip süresinin uzatıldığı, hasta sayısının artırıldığı ve tüm mikrobiyotanın incelenebildiği daha kapsamlı çalışmaların yapılması hedeflenmektedir.



## 7. ÖZET

**Romatoid artrit’li hastalarda, bağırsak mikrobiyotasındaki *Bacteroides fragilis*, *Prevotella copri*, *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus salivarius* türlerinin, tedaviye bağlı olarak değişiminin kantitatif olarak araştırılması**

### **Giriş ve amaç**

Bağırsak mikrobiyotası ve DMARD’lar arasında etkileşim bildirilmiştir, ancak bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, yeni tanı almış ve tedavi edilmemiş RA hastalarının dışkı örneklerindeki belirli bakteri türlerinin tedaviye bağlı kantitatif değişimlerini araştırmaktır.

### **Gereç ve yöntem**

Bu çalışma Aralık 2018- Haziran 2020 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Hastanesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya Romatoloji Bölümü’ne başvuran, yeni tanı almış RA hastaları ve sağlıklı kontroller dahil edilmiştir. Hastaların 9/12 ay boyunca tedavi takipleri yapılmış ve DAS28 düzeyleri kaydedilmiştir. Takibi yapılan hastalardan belirlenen aylarda 3 kez, sağlıklı kontrollerden 1 kez dışkı örneği alınmıştır. Dışkı örneklerinden DNA izole edilerek kGZ-PZR yöntemi ile *B.fragilis*, *P.copri*, *B.bifidum*, *L.salivarius*’un kopya sayıları belirlenmiştir. Hem yeni tanı almış hastaların ve sağlıklı kontrollerin bakteri kopya sayıları karşılaştırılmış hem de takip edilen hastaların tedaviye bağlı olarak bakteri kopya sayılarındaki değişimler araştırılmıştır.

### **Bulgular**

Yeni tanı almış 15 RA hastası ile 14 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edilmiş ve sekiz RA hastasının 9/12 ay boyunca tedavi takibi yapılmıştır. Yeni tanı almış hastalar, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında *P.copri*’nin hastalarda, *L.salivarius*’un sağlıklı kontrollerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla olduğu belirlenmiştir (sırasıyla  $p=0,046$ ,  $p=0,047$ ). *B.fragilis* ve *B.bifidum* kopya sayılarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p \geq 0.05$ ). Takip edilen hastaların 6. ayda büyük çoğunluğunda, 9/12. ayda tamamında tedavi başarısı elde edilmiştir. Tedavisi takip edilen hastalarda *P. copri* sayısında düzenli bir azalma olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunmamıştır. Ayrıca *B. fragilis*, *B. bifidum*, *L. salivarius*'un kopya sayılarında da anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir.

### **Sonuç**

Çalışmadan elde edilen bulgular *P.copri*'nin RA etiyolojisinde rol oynama potansiyenin yüksek olduğunu destekler niteliktedir. Tedavi takibi sürecinde *P.copri* kopya sayısının azalması tedavi başarısını gösteren bir belirteç olarak kullanılabilir. Probiyotik bakterilerin RA hastalığına karşı koruyucu olabileceği belirlenmiş olup, probiyotik bakteriler içerisinde yer alan *B.bifidum*'un tedavi takibinde belirteç olarak kullanılabilceği ve terapötik amaçlı uygulanabileceği düşünölmüştür. Sonuç olarak; bağırsak mikrobiyotası ve RA tedavileri arasındaki olası etkileşim mekanizmalarının daha fazla araştırılması, RA'nın etkili ve uzun vadeli yönetimi için umut vaat edebilir.

**Anahtar Sözcükler:** *P.copri*, *B.bifidum*, *L.salivarius*, *B.fragilis*, Romatoid Artrit Tedavisi

## 8. ABSTRACT

### **Quantitative investigation of treatment-related changes of *Bacteroides fragilis*, *Prevotella copri*, *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus salivarius* species in gut microbiota in patients with rheumatoid arthritis**

#### **Introduction and purpose**

Interaction between gut microbiota and disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) have been reported. But there are limited study in this subject. The aim of present study was to evaluate the treatment-related quantitative changes of certain bacterial species in stool samples for new onset and untreated patients with RA.

#### **Material and method**

This study was carried out between December 2018-June 2020 at the Kocaeli University Hospital. New onset patients with RA who applied the rheumatology department and healthy controls were included in the study. For 9/12 months, the patients' treatments followed-up and DAS28 scores were recorded. Stool samples were taken from the patients three times in the specified months and one time from the healthy controls. DNA was isolated from stool samples and copy numbers of *B.fragilis*, *P.copri*, *B.bifidum*, *L.salivarius* were determined by qPCR method. Bacterial copy numbers of both new onset patients and healthy controls were compared and changes in bacterial copy numbers depending on the treatment of the followed-up patients were evaluated.

#### **Results**

Fifteen new onset patients with RA and 14 healthy controls were included in this study. Eight of fifteen patients were followed up for 9/12 months. In comparison to healthy controls, new onset patients with RA had significantly abundant *P.copri* ( $p=0,046$ ). It was determined that *L.salivarius* was significantly higher in healthy controls ( $p = 0.047$ ). There was no significant difference in the copy numbers of *B.fragilis* and *B.bifidum* between the two groups ( $p>0.05$ ). Treatment success was achieved in the majority of the patients who were followed in the sixth month and in all of them in the ninth/twelve month. Although there was a decrease in the copy numbers of *P.copri* in the patients who were followed up

no statistically significant difference was found. Also there was no significant change determined in the copy numbers of *B.fragilis*, *B.bifidum*, *L.salivarius*.

### **Conclusions**

These findings from the study support that *P.copri* to play a role in RA etiology. During the treatment follow up, decrease in the abundance of *P.copri* can be used as a marker of treatment success. It has been determined that probiotic bacteria can be protective against RA disease. In the treated patients, the increase in *B.bifidum*, a probiotic bacterium, supports that it can be used as a marker in the follow-up of treatment of disease. It was also thought that this bacterium could be applied for therapeutic purposes. As a result, further investigation of possible mechanisms of the microbiome may hold promise for effective and long-term management of RA.

**Key words:** *B.fragilis*, *P.copri*, *B.bifidum*, *L.salivarius*, Rheumatoid arthritis treatment

## 9. KAYNAKLAR

1. Kalip K, Atak N. Bağırsak mikrobiyotası ve sağlık Intestinal microbiota and health. 2018;16(1).
2. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol. 2015;21(29):8836-8847.
3. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. Nat Rev Immunol. 2017;17(4):219-232.
4. De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. Clin Exp Immunol. 2019;195(1):74-85.
5. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2016;388(10055):2023-2038.
6. Wells PM, Williams FMK, Matey-Hernandez ML, Menni C, Steves CJ. 'RA and the microbiome: do host genetic factors provide the link? J Autoimmun. 2019;99(March):104-115.
7. Köhler, Günther, Kaudewitz, Lorenz. Current Therapeutic Options in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. J Clin Med. 2019;8(7):938.
8. Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2017;31(1):3-18.
9. Dwivedi M, Ansarullah, Radichev I, Kemp EH. Alteration of Immune-Mechanisms by Human Microbiota and Development and Prevention of Human Diseases. J Immunol Res. 2017;2017:2-4.
10. Rodrigues GSP, Cayres LCF, Gonçalves FP ve ark. Detection of increased relative expression units of *Bacteroides* and *Prevotella*, and decreased *Clostridium leptum* in stool samples from Brazilian rheumatoid arthritis patients: A pilot study. Microorganisms. 2019;7(10):1-13.
11. Xu H, Zhao H, Fan D ve ark. Interactions between Gut Microbiota and

- Immunomodulatory Cells in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* 2020;2020.
12. Wu X, He B, Liu J ve ark. Molecular insight into gut microbiota and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):1-11.
  13. Ragab G, Atkinson TP, Stoll ML. *The Microbiome in Rheumatic Diseases and Infection.*; 2018.
  14. Picchianti-Diamanti A, Panebianco C, Salemi S ve ark. Analysis of gut microbiota in rheumatoid arthritis patients: Disease-related dysbiosis and modifications induced by etanercept. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10).
  15. Zhang X, Zhang D, Jia H ve ark. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med.* 2015;21(8):895-905.
  16. Pascale A, Marchesi N, Marelli C ve ark. Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine.* 2018;61(3):357-371.
  17. Altındış M, Yılmaz K. Mikrobiyota Derleme. *Nobel Med.* 2017;13(1):9-15.
  18. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering.* 2017;3(1):71-82.
  19. Sekirov I, Russell SL, Caetano M Antunes L, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3):859-904.
  20. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(3):473-493.
  21. Maeda Y, Takeda K. Role of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med.* 2017;6(6):60.
  22. Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J Gastroenterol.* 2011;17(5):557-566.
  23. Integrative T, Microbiome H. *The Integrative Human Microbiome Project.* :1-8.
  24. Wei F. Conservation metagenomics : a new branch of conservation biology.



- 2019;62(2):168-178.
25. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13780-13785.
  26. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M ve ark. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019;7(1).
  27. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26(1):101-107.
  28. Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, De La Cochetiere MF. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol*. 2013;21(4):167-173.
  29. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E. Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(12):742-753.
  30. Steinway SN, Biggs MB, Jr TPL, Papin JA. Inference of Network Dynamics and Metabolic Interactions in the Gut Microbiome. Published online 2015:1-25.
  31. Jernberg C, Lo S, Edlund C, Jansson JK. Mini-Review Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. Published online 2010:3216-3223.
  32. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. 2017;0:1823-1836.
  33. Gioia C, Lucchino B, Tarsitano MG, Iannuccelli C, Di Franco M. Dietary habits and nutrition in rheumatoid arthritis: Can diet influence disease development and clinical manifestations? *Nutrients*. 2020;12(5).
  34. Li Z, Quan G, Jiang X, Yang Y, Ding X, Zhang D. Effects of Metabolites Derived From Gut Microbiota and Hosts on Pathogens. 2018;8(September).

35. Molecular CDB. Effect of D-Amino Acids on Structure and Synthesis of Peptidoglycan in *Escherichia coli*. 1992;174(17):5549-5559.
36. Pan H, Li R, Li T, Wang J, Liu L. Whether Probiotic Supplementation Benefits Rheumatoid Arthritis Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Engineering*. 2017;3(1):115-121.
37. Mahony LO, Mccarthy J, Kelly P ve ark. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in Irritable Bowel Syndrome : Published online 2005:541-551.
38. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS ve ark. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 2013;2:1-20.
39. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J Obes*. 2016;2016.
40. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM ve ark. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: A case-control study. *BMC Med*. 2013;11(1):1-12.
41. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Heal Dis*. 2015;26(0).
42. Bodkhe R, Balakrishnan B, Taneja V. The role of microbiome in rheumatoid arthritis treatment. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2019;11:1-16.
43. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care*. 2012;18(13 Suppl):295-302.
44. Choi ST, Lee KH. Clinical management of seronegative and seropositive rheumatoid arthritis: A comparative study. *PLoS One*. 2018;13(4):1-10.
45. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2020;110(January):102400.
46. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF ve ark. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet*.

- 2010;42(6):508-514.
47. Boissier MC, Biton J, Semerano L, Decker P, Bessis N. Origins of rheumatoid arthritis. *Jt Bone Spine*. 2020;87(4):301-306.
  48. Maeda Y, Takeda K. Host–microbiota interactions in rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med*. 2019;51(12).
  49. Df L, Apatzidou D, A-m Q ve ark. Influence of periodontal disease , *Porphyromonas gingivalis* and cigarette smoking on systemic anti-citrullinated peptide antibody titres. Published online 2013:907-915.
  50. Wegner N, Wait R, Sroka A ve ark. NIH Public Access. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(9):2662-2672.
  51. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007;370(9602):1861-1874.
  52. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2018;320(13):1360-1372.
  53. Kang Y, Cai Y, Zhang X, Kong X, Su J. Darmmikrobiota und rheumatoide Arthritis: von der Pathogenese zu neuen therapeutischen Strategien. *Z Rheumatol*. 2017;76(5):451-457.
  54. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ ve ark. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569-2581.
  55. Senolt L. Emerging therapies in rheumatoid arthritis: Focus on monoclonal antibodies [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*. 2019;8:1-12.
  56. Bullock J, Rizvi SAA, Saleh AM ve ark. Rheumatoid arthritis: A brief overview of the treatment. *Med Princ Pract*. 2019;27(6):501-507.
  57. Ferreira JF, Ahmed Mohamed AA, Emery P. Glucocorticoids and Rheumatoid

- Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016;42(1):33-46.
58. Hennessey VG, Leon-Novelo LG, Li J, Zhu L, Chi E, Ibrahim JG. A Bayesian Joint model for Longitudinal DAS28 Scores and Competing Risk Informative Drop Out in a Rheumatoid Arthritis Clinical Trial. Published online 2018:1-16.
59. Alpizar-Rodríguez D, Pluchino N, Canny G, Gabay C, Finckh A. The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom).* 2017;56(8):1254-1263.
60. Kohashi O, Kuwata J, Umehara K, Uemura F, Takahashi T, Ozawa A. Susceptibility to adjuvant-induced arthritis among germfree, specific-pathogen-free, and conventional rats. *Infect Immun.* 1979;26(3):791-794.
61. Vaahtovuori J, Munukka E, Korkeamäki M, Luukkainen R, Toivanen P. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008;35(8):1500-1505.
62. Liu X, Zou Q, Zeng B, Fang Y, Wei H. Analysis of fecal *Lactobacillus* community structure in patients with early rheumatoid arthritis. *Curr Microbiol.* 2013;67(2):170-176.
63. Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E ve ark. Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(11):2646-2661.
64. Alpizar-Rodriguez D, Lesker TR, Gronow A ve ark. *Prevotella copri* in individuals at risk for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(5):590-593.
65. Kishikawa T, Maeda Y, Nii T ve ark. Metagenome-wide association study of gut microbiome revealed novel aetiology of rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(1):103-111.
66. Sun Y, Chen Q, Lin P ve ark. Characteristics of Gut Microbiota in Patients With Rheumatoid Arthritis in Shanghai, China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(October):1-11.
67. Lee JY, Mannaa M, Kim Y, Kim J, Kim GT, Seo YS. Comparative analysis of fecal

- microbiota composition between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Genes (Basel)*. 2019;10(10).
68. Rogier R, Koenders MI, Abdollahi-Roodsaz S. Toll-like receptor mediated modulation of T cell response by commensal intestinal microbiota as a trigger for autoimmune arthritis. *J Immunol Res*. 2015;2015.
  69. Stewart L, D. M. Edgar J, Blakely G, Patrick S. Antigenic mimicry of ubiquitin by the gut bacterium *Bacteroides fragilis*: a potential link with autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2018;194(2):153-165.
  70. Surana NK, Kasper DL. The yin yang of bacterial polysaccharides: Lessons learned from *B. fragilis* PSA. *Immunol Rev*. 2012;245(1):13-26.
  71. Telesford KM, Yan W, Ochoa-Reparaz J ve ark. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells and Treg function. *Gut Microbes*. 2015;6(4):234-242.
  72. Turrone F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, Sinderen D Van, Ventura M. *Bifidobacterium bifidum* : A Key Member of the Early Human Gut Microbiota. Published online 2019:1-13.
  73. Taneja V. Arthritis susceptibility and the gut microbiome. *FEBS Lett*. 2014;588(22):4244-4249.
  74. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, Koenders MI ve ark. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest*. 2008;118(1):205-216.
  75. Zaragoza-García O, Castro-Alarcón N, Pérez-Rubio G, Guzmán-Guzmán IP. DMARDs–gut microbiota feedback: Implications in the response to therapy. *Biomolecules*. 2020;10(11):1-23.
  76. Liu X, Zhang J, Zou Q ve ark. *Lactobacillus salivarius* Isolated from Patients with Rheumatoid Arthritis Suppresses Collagen-Induced Arthritis and Increases Treg Frequency in Mice. *J Interf Cytokine Res*. 2016;36(12):706-712.

77. Pan H, Guo R, Ju Y ve ark. A single bacterium resurrects the microbiome-immune balance to protect bones from destruction in a rat model of rheumatoid arthritis. *Microbiome*. Published online 2019:1-11.
78. Pianta A, Arvikar S, Strle K ve ark. Evidence of the Immune Relevance of *Prevotella copri*, a Gut Microbe, in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(5):964-975.
79. Author C, Area A. “ Real-Time PCR ” ve Uygulama Alanlar ı. 2009;2(2):3-5.
80. Bustin SA. Real-Time PCR. *Encycl Diagnostic Genomics Proteomics*. Published online 2005:1117-1125.
81. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci*. 2005;109(4):365-379.
82. Sewerin P, Vordenbaeumen S, Hoyer A ve ark. Silent progression in patients with rheumatoid arthritis: is DAS28 remission an insufficient goal in RA? Results from the German Remission-plus cohort. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18(1):1-9.
83. Horta-Baas G, Romero-Figueroa MDS, Montiel-Jarquín AJ, Pizano-Zárate ML, García-Mena J, Ramírez-Durán N. Intestinal Dysbiosis and Rheumatoid Arthritis: A Link between Gut Microbiota and the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res*. 2017;2017.
84. Zhou B, Xia X, Wang P ve ark. Induction and Amelioration of Methotrexate-Induced Gastrointestinal Toxicity are Related to Immune Response and Gut Microbiota. *EBioMedicine*. 2018;33:122-133.
85. Kouchaki E, Tamtaji OR, Salami M ve ark. Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with multiple sclerosis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr*. 2017;36(5):1245-1249.

## 10. EKLER

**Ek 1:** Hasta takip formu



Ek 1.

## HASTA TAKİP FORMU

Tarih: .../.../....

Adı-Soyadı:

Yaşı:

Hasta No:

İletişim:

Cinsiyeti: Kadın ( ) Erkek ( )

Öz Geçmiş:

Soy Geçmiş:

Gebelik durumu: Evet ( ) Hayır ( )

Beslenme alışkanlığı: Et ağırlıklı ( ) Sebze Ağırlıklı ( ) Dengeli ( )

Yoğurt, kefir, tarhana, turşu gibi gıdaların tüketim sıklığı:

Her gün ( )

Haftada birkaç kez ( )

Ayda birkaç kez ( )

Yılda birkaç kez ( )

Hiç ( )

Bitkisel veya probiyotik tedavi kullanıyor musunuz? Evet ( ) Hayır ( )

Sigara kullanımı: Evet ( ) Miktarı: .....Paket/Gün Hayır ( )



Son 2 Ay İçerisinde Ağızdan Antibiyotik kullandınız mı? Evet ( ) Hayır ( )

Son 2 Ay İçerisinde ishal, kusma vb. Őikayetleriniz oldu mu? Evet ( ) Hayır ( )

Ek Hastalıklar (İnflamatuvar Barsak Hastalıkları ve Diğer Romatizmal Hastalıklar gibi ek hastalığı olan hastalar çalışmaya alınmayacaktır.):

Kullanılan İlaçlar:

Tedavi Planı:

RF	
Anti-CCP	

DAS28 KRİTERLERİ	SONUÇ
Hassas eklem sayısı	
Şiş eklem sayısı	
Eritrosit sedimentasyon hızı	
CRP	
VAS (Genel sağlık değerlendirmesi)	

DEğerLENDİRME TÜRÜ	PUAN	DERECELENDİRME
DAS28		
DAS28-CRP		