

Metotreksat Tedavisi Alan Romatoid Artrit Hastalarında Mitokondriyal Disfonksiyon, Autofaji ve İnflamasyon Üzerine Bir Pilot Çalışma

 Valentina Mihaylova,^{1,2}  Zguro Batalov,^{3,4}  Rositsa Karalilova,^{3,4}  Anastas Batalov,^{3,4}
 Maria Kazakova,^{1,2}  Victoria Sarafian^{1,2}

¹Tıp Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Bölümü, Filibe, Bulgaristan

²Tıp Üniversitesi Araştırma Enstitüsü, Filibe, Bulgaristan

³Tıp Üniversitesi, İç Hastalıkları Protez Bölümü, Filibe, Bulgaristan

⁴Kaspela Üniversitesi Hastanesi, Romatoloji Kliniği, Filibe, Bulgaristan



Atıf için yazım şekli:

Mihaylova V, Batalov Z, Karalilova R, Batalov A, Kazakova M, Sarafian V. Metotreksat Tedavisi Alan Romatoid Artrit Hastalarında Mitokondriyal Disfonksiyon, Autofaji ve İnflamasyon Üzerine Bir Pilot Çalışma. Orthop Surg Trauma 2025;1(2):61–68.

Yazışma Adresi:

Valentina Mihaylova,
Tıp Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji
Bölümü, Filibe, Bulgaristan
E-posta:
valentina.mihaylova@mu-plovdiv.bg

Geliş Tarihi: 11.06.2025

Revizyon Tarihi: 14.07.2025

Kabul Tarihi: 30.07.2025

Yayın Tarihi: 05.09.2025

Etik: Plovdiv Tıp Üniversitesi
Bilimsel Etik Kurulu (Onay
Numarası: 4/08.06.2022, Tarih:
20.06.2022)

Çıkar Çatışması: Yoktur.

Finansal Destek: Avrupa
Birliği–NextGenerationEU,
Bulgaristan Cumhuriyeti Ulusal
Kurtarma ve Dayanıklılık Planı,
no. BG-RRP-2.004-0007-C01
ve Plovdiv Tıp Üniversitesi, no.
15-2025.

Orthopedic Surgery & Trauma -
Available online at www.ortst.org



This work is licensed under
a Creative Commons
Attribution-NonCommercial
4.0 International License.

ÖZET

Giriş ve Amaç: Romatoid artrit (RA), kalıcı sinovyal inflamasyon, kıkırdak yıkımı ve eklem harabiyeti ile karakterize kronik, sistemik bir otoimmün hastalıktır. RA'da mitokondriyal disfonksiyon, düzenlenemeyen autofaji ve inflamasyon çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir; ancak tedavi sonrası bu süreçlerin dinamiklerini izleyen çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, RA hastalarında metotreksatın (MTX) metabolik parametreler ile autofaji ve inflamasyon belirteçleri üzerindeki doğrudan etkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya yeni tanı almış on RA hastası dâhil edilmiştir. Hastalar, altı ay boyunca onaylanmış optimal günlük dozlarda MTX ile tedavi edilmiştir. Tedavi öncesinde ve takip döneminden sonra konvansiyonel biyokimyasal ve immünolojik göstergeler, metabolik parametreler ve inflamasyon ile autofajiye yönelik biyobelirteçler incelenmiştir.

Bulgular: Tüm klinik ve laboratuvar parametrelerinde tedavi sonrası iyileşme gözlemlenmiştir. Bazal solunumda ($p=0,018$) ve adenosin trifosfat (ATP) üretiminde ($p=0,03$) azalma tespit edilmiş; MTX tedavisini takiben kanda kitinaz-3-benzeri protein 1 (YKL-40) ($p=0,007$) ve lizozomal membran ilişkili protein 1 (LAMP1) ($p=0,03$) düzeylerinde anlamlı düşüş gözlenmiştir. Tedavi öncesinde LAMP1 ile bazal solunum ($p=0,022$, $r=0,928$); LAMP2 ile ATP üretimi ($p=0,033$, $r=-0,886$); ve 28 eklemde hastalık aktivite skoru (DAS28) ile proton sızıntısı ($p=0,017$, $r=0,941$) arasında güçlü korelasyonlar saptanmıştır. Tedavi sonrasında ise LAMP1 ile yedek solunum kapasitesi ($p=0,003$, $r=0,919$); ve 7 eklem ultrason skoru (GUS7) ile LAMP2 ($p=0,027$, $r=0,692$) arasında ilişkiler gözlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, MTX tedavisi sonrasında RA hastalarında mitokondriyal fonksiyon parametreleri ile autofaji ve inflamasyonla ilişkili proteinler arasındaki korelasyonlara dair yeni veriler sunulmuştur. Bu pilot bulgular, hastalık şiddeti ve tedavi yanıtını izlemeye yönelik gelecekteki klinik uygulamalar için yol gösterici olabilir.

Anahtar Kelimeler: Autofaji, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, romatoid artrit.

GİRİŞ

Romatoid artrit (RA), kalıcı sinovyal inflamasyon, kıkırdak yıkımı ve eklem harabiyeti ile karakterize kronik, sistemik bir otoimmün hastalıktır. Etiyopatogenezi çok faktörlü olmakla birlikte, artan kanıtlar mitokondriyal disfonksiyonun bağışıklık düzensizliği ve kronik inflamasyonun merkezi bir etmeni olduğunu göstermektedir.^[1]

Mitokondriler, yalnızca hücrel enerji metabolizması için değil, aynı zamanda redoks sinyalleme, apoptoz ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesi için de hayati organellerdir. RA'da mitokondriyal bozulma, hem sinovyal fibroblastlarda hem de bağışıklık hücrelerinde gözlenmiş olup, bunun sonucunda aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, değişmiş bioenerjetik yapı ve mitokondriyal DNA (mtDNA) ile diğer mitokondriyal bileşenlerin sitozolik salınımı meydana gelir.^[2-4] RA'da sinovyal fibroblastlar, makrofajlar ve infiltrasyon gösteren bağışıklık hücreleri bozulmuş mitokondriyal bioenerjetik özellikler sergiler; bu durum genellikle oksidatif fosforilasyondan glikolize metabolik bir kayma ile karakterizedir. Bu yeniden programlama, aşırı mitokondriyal reaktif oksijen türü (mtROS) üretimi ile birlikte olup, mtDNA'yı, lipidleri ve proteinleri daha da zararlandırarak oksidatif stres döngüsünü sürdürür.^[5]

Mitokondrilerin yanı sıra, lizozomlar da birçok hastalıkta rol oynayan çok işlevli organellerdir. Lizozomla ilişkili membran proteinleri 1 ve 2 (LAMP1 ve LAMP2), başlıca lizozomal membranda bulunan integral glikoproteinler olup lizozomal bütünlüğün korunması, autofaji ve bağışıklık düzenlemesinde önemli roller oynarlar.^[6] Yakın tarihli araştırmalar, bu proteinlerin RA dahil olmak üzere otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynadığını vurgulamaktadır. Sinovyal fibroblastlar ve makrofajların artırılmış autofaji gösterdiği RA'da bu süreç kısmen LAMP1 ve LAMP2 tarafından düzenlenmektedir. Bu proteinler, otofagozomların lizozomlarla kaynaşmasını kolaylaştırır ve hücrel kalıntıları hasar görmüş organellerin (bozulmuş mitokondriler dâhil) yıkımını destekler. Düzensiz autofaji, sinovyal iltihabın kalıcılığına ve RA sinoviyositlerinde apoptoza direnç gelişimine yol açabilir.^[7,8] LAMP1 ve LAMP2'nin inflamatuvar ve neoplastik durumlarda hücre yüzeyine taşındığı gösterilmiştir; burada bağışıklık hücreleriyle etkileşime girebilir veya lizozomal içeriklerin salınımına katkıda bulunabilirler.^[9] Bu yüzey ekspresyonu, RA'da artmış sitokin üretimi ve eklem dokusu hasarı ile ilişkilidir. Ayrıca, LAMP proteinlerinin sinovyal hücreler arasında inflamatuvar mediyatörlerin taşınmasında görevli ekstraselüler veziküllerin oluşumunu etkileyebileceği öne sürülmektedir.^[10]

Bağışıklık aracılı inflamasyon, RA'daki temel patojenetik etkenlerden biri olduğundan, IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin rolünü incelemek önemlidir. Her iki sitokin de sinovyal inflamasyonun neden olduğu kırık yıkımı ve hastalığın sistemik belirtilerine katkıda bulunur. IL-1, özellikle IL-1 β , RA eklemde aktifleşmiş makrofajlar, sinovyal fibroblastlar ve infiltrasyon gösteren bağışıklık hücreleri tarafından üretilir.

^[11] IL-6 ise RA sinovyumunda bol miktarda eksprese edilir ve hem lokal eklem inflamasyonuna hem de yorgunluk, anemi ve osteoporoz gibi sistemik belirtilere katkıda bulunur. IL-6, gp130 reseptör kompleksi üzerinden sinyal iletir ve JAK/STAT3 (Janus

kinaz/sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3) yolunu aktive ederek Th17 farklılaşmasını, B hücresi aktivasyonunu ve akut faz protein sentezini teşvik eder.^[12] IL-6 aynı zamanda anjiyogenez ve sinovyal pannus oluşumunu da artırır.^[13]

İnflamasyonla ilişkili bir diğer molekül ise doku yeniden şekillenmesi ve bağışıklık yanıtında rol oynayan bir glikoprotein olan kitinaz-3-benzeri protein 1'dir (YKL-40). YKL-40 düzeylerinin yüksek olması, çeşitli inflamatuvar durumlarla ilişkilendirilmiş olup, inflamasyonun değerlendirilmesinde faydalı bir biyobelirteçtir.^[14] Önceki çalışmalarımızda farklı patolojilerde YKL-40 düzeylerinde %50'nin üzerinde bir artış saptanmış; klinik olarak aktif RA hastalarında ise bu glikoprotein %95 oranında yüksek bulunmuştur.^[15]

Çalışma hipotezimiz, mitokondriyal disfonksiyon, interlökinler ve lizozomla ilişkili membran proteinleri arasındaki etkileşimin, oksidatif stres ve inflamasyonun kendini sürdüren bir döngüsünü oluşturduğudur. Bu döngü, sinovitisin kalıcılığına ve eklem hasarının ilerlemesine katkı sağlamaktadır. Bu mekanizmaların aydınlatılması, yalnızca RA patogeneğine dair anlayışımızı geliştirmekle kalmayacak, aynı zamanda mitokondriyal bütünlük ve inflamatuvar sinyal yollarını hedef alan yeni tedavi yaklaşımlarına da kapı aralayabilecektir. Bu nedenle, RA hastalarında mitokondriyal fonksiyon, autofaji ve inflamasyonla ilişkili molekülleri incelemeyi ve bu parametrelerin en yaygın tedavi yöntemlerinden biri olan metotreksat (MTX) tedavisi sonrasındaki dinamiklerini takip etmeyi amaçladık.

Bu temel patojenetik süreçlerin belirleyici biyobelirteçleri ile tedavi etkileri arasındaki korelasyonlara dair yeni veriler sunmaktayız.

YÖNTEMLER

Hastalar

Çalışmaya, Amerikan Romatoloji Koleji (ACR) ve Avrupa Romatizma ile Mücadele Birliği (EULAR) tarafından 2010 yılında belirlenen kriterlere göre tanı almış, daha önce tedavi edilmemiş 10 RA hastası dâhil edilmiştir. Hastalara altı ay süreyle optimal onaylanmış günlük dozlarda (ortalama 15 mg/hafta oral yolla) MTX tedavisi uygulanmıştır. Tedavi başlangıcında ve takip döneminin sonunda romatoid faktör (RF), anti-siklik sitriline peptit (anti-CCP) antikorları ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ile C-reaktif protein (CRP) gibi akut faz reaktanlarını içeren konvansiyonel biyokimyasal ve immünolojik belirteçler ölçülmüştür. Tedavi öncesi ve sonrası venöz kan örnekleri toplanmıştır. Çalışma, Üniversite Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Protokol No: 4/08.06.2022). Tüm katılımcılardan Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Tüm hastalarda RA aktivitesi, 28 eklemi değerlendiren Hastalık Aktivite Skoru 28 (DAS28) kullanılarak ölçülmüştür. Bu skor, hassas ve şiş eklem sayısı, hastanın hastalık aktivitesine ilişkin genel değerlendirmesi ve ESH veya CRP düzeylerine dayanmaktadır. Hastalık aktivitesinin sınıflandırılmasında eşik değerler şunlardır: remisyon $\leq 2,6$; düşük aktivite $\leq 3,2$; orta aktivite $\leq 5,1$; yüksek aktivite $> 5,1$.^[16]

Plazma ve Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PBMC) İzolasyonu

Her hastadan, standart venipunktur prosedürlerine uygun olarak etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere venöz kan alınmıştır. Örnekler 10 dakika süreyle 1800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Plazma toplanmış, alikotlanmış ve analiz edilene kadar -80°C 'de saklanmıştır. Buffy coat tabakası, 2 mL fosfat tamponlu salin (PBS) (pH=7,4) ile karıştırılmış ve 1:1 oranında Histopaque (Sigma-Aldrich, d=1,077 g/mL) üzerine tabakalanarak 1800 rpm'de 30 dakika yoğunluk gradyan santrifügasyonuna tabi tutulmuştur. PBMC tabakası aspire edilmiş, 10 mL PBS ile iki kez yıkanmış ve 1800 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. PBMC'ler, %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri (Gibco CAT#P04-18000) ile kültüre alınmıştır. Hücreler, 24 gözlü plakalarda bir gece süreyle 37°C 'de %5 CO_2 ve yüksek nemli ortamda inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı ve sayımı, "LUNA" otomatik sitometresi (Logos Biosystems, Anyang, Kore) kullanılarak değerlendirilmiştir. Metabolik testler için hücreler, RPMI-1640 ortamı kullanılarak 8 gözlü Seahorse mikrotablalarına kuyu başına 2×10^5 hücre olacak şekilde ayarlanmıştır. Canlılık ve hücre sayısı, metabolik analiz öncesinde hemen doğrulanmıştır.

Ultrason Muayenesi

El bilekleri, eller ve ön ayakların ultrasonografik değerlendirmesi, eklem ve tendon incelemeleri için ML6-15-D Matrix Array lineer prob kullanılan GE Logic E9 cihazı ile yapılmıştır. İki boyutlu ultrason (US) (B-modu/gri tonlamalı US) ve power Doppler US uygulanmıştır. Gri tonlamalı ultrason (GSUS) frekansı, incelenen eklem göre 11–15 MHz arasında ayarlanmış; GSUS kazancı ise eklem bölgesi ve hasta özelliklerine göre ayarlanmış, ortalama değer %50 olarak belirlenmiştir. Power Doppler ultrason (PDUS) için aşağıdaki ayarlar kullanılmıştır: 8,3 MHz frekans, 600–800 Hz darbe tekrarlama frekansı, eklem bölgeleri ve hasta özelliklerine göre ayarlanmış yaklaşık %50 PDUS kazancı ve düşük duvar filtresi. Backhaus ve ark.^[17] geliştirdiği 7 eklemli ultrason (GUS7) skorlama sistemi uygulanmıştır.

Klinik olarak baskın el ya da ayakta, şişlik veya hassasiyet açısından en fazla etkilenen yedi eklem, GUS7 sistemine göre GSUS ve PDUS ile değerlendirilmiştir: el bileği, ikinci ve

üçüncü metakarpofalangeal (MCP) eklemler, ikinci ve üçüncü proksimal interfalangeal (PIP) eklemler ile ikinci ve beşinci metatarsofalangeal (MTP) eklemler. Sinovit ve tenosinovit varlığı, Romatolojide Sonuç Ölçütleri (OMERACT) standart protokolleri ve tanımlarına göre değerlendirilmiştir.^[18] Skorlama aralıkları şu şekildedir: GSUS sinovit için 0–27, GSUS tenosinovit/paratenonit için 0–7, PDUS sinovit için 0–39 ve PDUS tenosinovit/paratenonit için 0–21. GUS7 skoru, GSUS'taki sinovit ve tenosinovit/paratenonit skorları ile PDUS'taki sinovit ve tenosinovit skorlarının toplamı olarak hesaplanmıştır. DAS28 hastalık aktivitesi için referans değerler şu şekildedir: remisyon $\leq 2,6$; düşük hastalık aktivitesi $> 2,6$ –3,2; orta hastalık aktivitesi $> 3,1$ –5,1; yüksek hastalık aktivitesi $> 5,1$.

YKL-40, IL-1 β , IL-6 ve LAMP'lerin Plazma Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi

Tüm hastalarda YKL-40 (Quidel, KAT#8020), IL-1 β (Rand D, KAT#DLB50), IL-6 (Elabscience, KAT#E-EL-H6156) ve LAMP'lerin (SunRed, KAT#DZE201124185/6D) plazma düzeyleri ELISA (Enzim Bağlantılı İmmüno sorbent Analiz) yöntemi ile ölçülmüştür. Analizler, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak çift örnekli (duplicate) şekilde gerçekleştirilmiştir. Analiz içi varyasyon katsayısı (CV) %10, analizler arası varyasyon katsayısı ise $< \%12$ olarak belirlenmiştir. Testler, sandviç bazlı ELISA yöntemi kullanılarak yapılmış ve optik yoğunluk 450 nm dalga boyunda Tecan Sunrise ELISA okuyucusu ile ölçülmüştür.

Mitokondriyal Fonksiyonun Mito Stress Test ile Değerlendirilmesi

Mito Stress Test, canlı hücrelerde mitokondriyal solunumun gerçek zamanlı göstergesi olan oksijen tüketim hızını (OCR) ölçmektedir. Biyoenerjetik profil beş temel parametre ile tanımlanmıştır: adenosin trifosfat (ATP) üretimi, proton sızıntısı, maksimal solunum kapasitesi (MRC), yedek solunum kapasitesi (SRC) ve mitokondriyal olmayan oksijen tüketimi (NMOC). Mikrotabaka plakaları çift distile su ile nemlendirilmiş ve PBMC'ler venipunkturdan bir gün sonra kültüre edilmiştir. Ertesi gün, hücre canlılığı ve sayısı değerlendirildikten sonra hücreler, Seahorse XFp Bazal Ortamı, pH 7,4 (Agilent KAT#103576-100) kullanılarak 2×10^5 hücre/mL yoğunluğunda nemlendirilmiş tabakalara ekilmiştir. Analiz öncesinde, PBMC'lerin kuyucuklarda eşit dağıldığını doğrulamak amacıyla ters mikroskop ile görsel inceleme yapılmıştır. PBMC'ler, aynı deney protokolüne sıkı biçimde bağlı kalınarak, ardışık çalışmalarda üçlü örnekler (triplicate) hâlinde analiz edilmiştir. Tüm PBMC'ler aynı şekilde izole edilmiş ve işlenmiştir. Hücreler izolasyonun hemen ardından sayılmış, ardından doğrudan biyoenerjetik ölçümler yapılmıştır. Her biyoenerjetik deney üçlü olarak gerçekleştirilmiştir. Hasta verileri, hem tedavi öncesi hem de sonrası olmak üzere üçlü örneklemle istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Mitokondriyal solunum, inhibitörlerin uygulanmasını takiben gerçek zamanlı olarak incelenmiştir. Mitokondriyal ATP üretimini değerlendirmek için bazal OCR değeri oligomisin ile ölçülmüştür. Hücrelerin karbonil siyanid-p-trifloro-metoksifenilhidrazon (FCCP) ile muamelesinden sonra, maksimum mitokondriyal solunum ve yedek solunum kapasitesi belirlenmiştir. Son olarak rotenon ve antimycin A eklenerek mitokondriyal olmayan oksijen tüketim hızları değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Veriler, Prism yazılımı sürüm 10 kullanılarak istatistiksel olarak işlenmiştir. Grup ortalamalarını belirlemek için tanımlayıcı istatistikler uygulanmıştır. Veri dağılımının normalliği değerlendirilmiş ve tüm değişkenlerin normal dağılım gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, her iki grup için istatistiksel anlamlılığın belirlenmesinde eşleştirilmiş t-testi kullanımını geçerli kılmıştır. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Metabolik test verileri, Wave yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Yazılım

Klinik ve laboratuvar verileri, Prism yazılımı sürüm 10 ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Metabolik test verileri ise Wave yazılımı kullanılarak işlenmiştir.

BULGULAR

Tedavi öncesi ve sonrası klinik ve laboratuvar parametreleri değerlendirilerek 10 RA hastasında hastalık aktivitesini inceledik. RA hastalarında hastalık aktivitesini değerlendirmek amacıyla kullanılan laboratuvar değerleri (CRP, RF, ESH ve

anti-CCP) ile ultrason skorlarını (DAS28, GUS7) içeren veriler Tablo 1'de sunulmuştur. İncelenen tüm parametrelerde tedavi sonrası iyileşme gözlenmiştir.

Mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesinde metabolik Mito Stress Test kullanılmıştır. Analiz sonucunda tedavi sonrasında iki ana parametrede azalma saptanmıştır (Şekil 1A-B): bazal solunum ($p=0,018$) ve ATP üretimi ($p=0,03$). Veriler ortalama±standart sapma (SS) şeklinde sunulmuştur.

Her iki grupta inflamasyonu değerlendirmek amacıyla tedavi öncesi ve sonrası IL-1 β , IL-6 ve YKL-40 sitokinlerinin plazma düzeyleri ölçülmüştür. YKL-40 düzeylerinde anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p=0,0078$) (Şekil 2); bununla birlikte altı aylık tedavi sonrası standart inflamatuvar belirteçler olan CRP ve ESH düzeylerinde de azalma gözlenmiştir. Her iki interlökin düzeyindeki düşüş belirgin olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

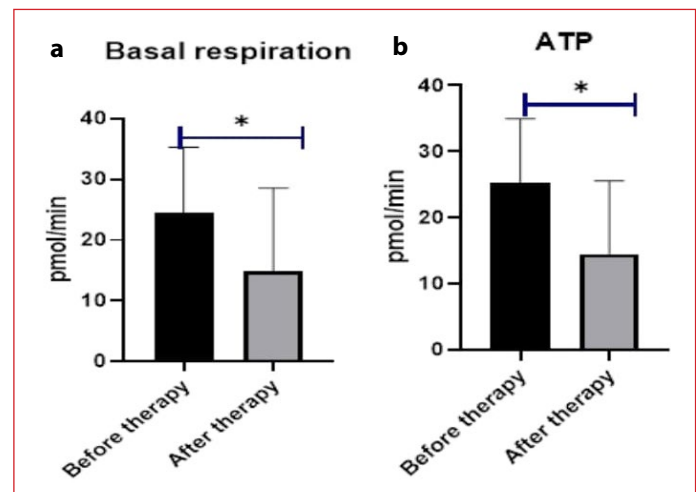
LAMP moleküllerinin plazma düzeylerinin değerlendirilmesinde, tedavi sonrası LAMP1 düzeylerinde anlamlı azalma gözlenmiştir ($p=0,03$) (Şekil 3). LAMP2 düzeylerinde artış tespit edilmiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

RA'daki hücresel mekanizmalar ve klinik sonuçlar arasındaki etkileşimi daha iyi açıklayabilmek amacıyla, MTX tedavisi öncesi ve sonrası klinik skorlar, inflamatuvar sitokinler, autofajile ilişkili proteinler ve mitokondriyal fonksiyonlar arasındaki korelasyonlar analiz edilmiştir (Şekil 4). Tedavi öncesinde anlamlı ilişkiler şu şekilde saptanmıştır: LAMP1 ile bazal solunum ($p=0,022$, $r=0,928$); LAMP2 ile ATP üretimi ($p=0,033$, $r=-0,886$); DAS28 ile proton sızıntısı ($p=0,017$, $r=0,941$); YKL-40 ile IL-6 ($p=0,035$, $r=0,759$) (Şekil 4A).

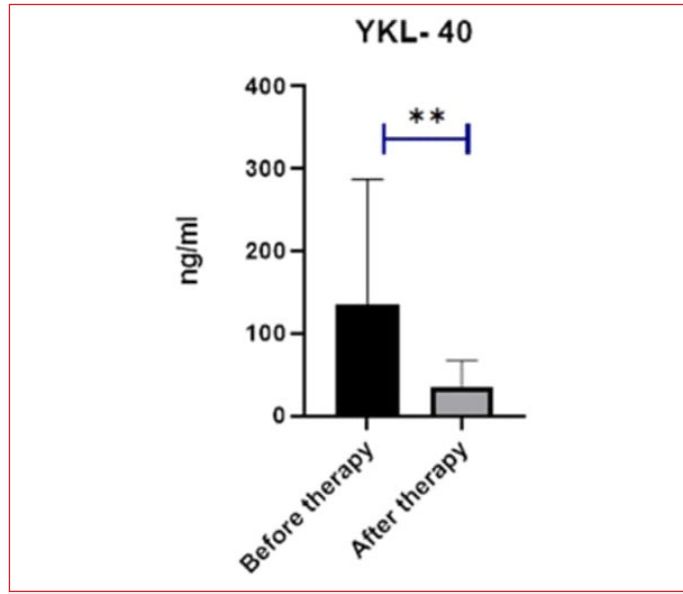
Tablo 1. MTX ile tedavi öncesi ve sonrası RA hastalarında klinik laboratuvar parametreleri ve ultrason skorları

Parametreler	Tedavi Öncesi (Ort.±SS)	Tedavi Sonrası (Ort.±SS)
CRP (mg/l), < 5	51.62±12.9	32.7±4.9
RF (IU/ml), < 10	36.06±8.2	10.17±3.35
ESR (mm/h), < 15	129.4±25.77	87.18±29.09
Anti-CCP-Ab (IU/ml), < 17	739.9±157	471.8±430.2
DAS28, remission ≤ 2.6	5.63±0.16	3.59±0.23
GUS7 score, (0-108)	26.06±1.65	11.29±1.08

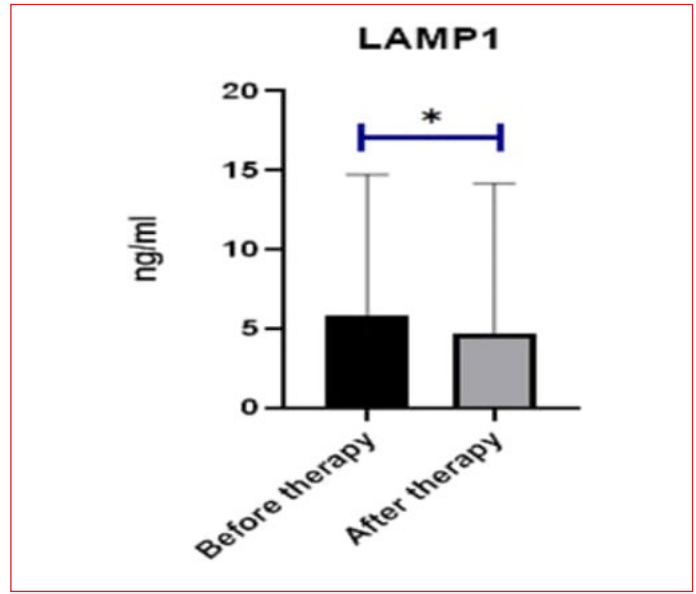
Veriler, GraphPad Prism 10 kullanılarak ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur. CRP: C-reaktif protein, RF: Romatoid faktör, ESH: Eritrosit sedimentasyon hızı, Anti-CCP-Ab: Anti-siklik sitriline peptit antikor, DAS28: Hastalık aktivite skoru, GUS7: Ultrason skoru.



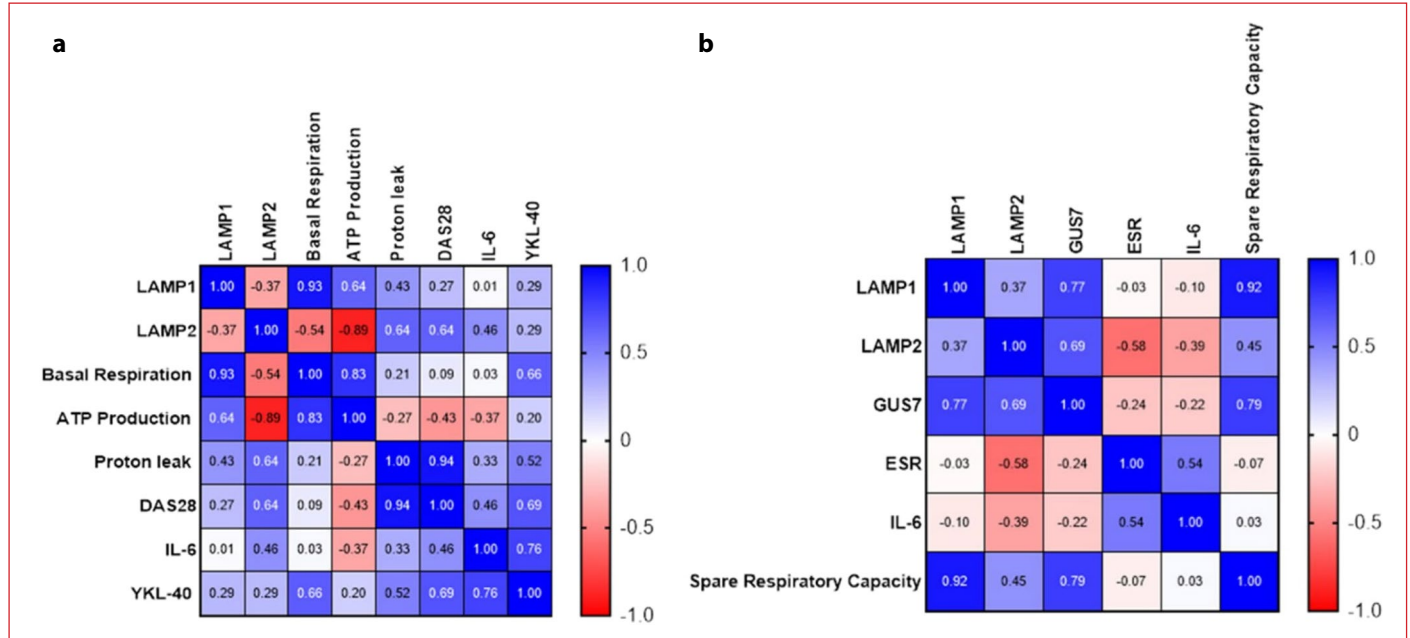
Şekil 1. MTX tedavisi öncesi ve sonrası RA hastalarının PMBC'lerinde bazal solunum (a) ve ATP (b).



Şekil 2. MTX tedavisi öncesi ve sonrası RA hastalarının plazma YKL-40 düzeyleri. Ortalama±SD olarak sunulmuştur.



Şekil 3. MTX tedavisi öncesi ve sonrası RA hastalarının LAMP1 plazma düzeyleri. Ortalama±SD olarak sunulmuştur.



Şekil 4. (a) Tedavi öncesi laboratuvar inflamasyon göstergeleri, mitokondriyal fonksiyon ve ultrasonografik bulgular arasındaki ilişkileri yansıtan korelasyon matrisi. Sayısal değerler korelasyon r katsayısını yansıtmaktadır. **(b)** MTX tedavisi sonrası laboratuvar inflamasyon göstergeleri, mitokondriyal fonksiyon ve ultrasonografik bulgular arasındaki ilişkileri yansıtan korelasyon matrisi. Sayısal değerler korelasyon r katsayısını yansıtmaktadır.

Tedavi sonrasında ise LAMP1 ile yedek solunum kapasitesi ($p=0,003$, $r=0,919$) ve GUS7 ile LAMP2 ($p=0,027$, $r=0,692$) arasında güçlü korelasyonlar bulunmuştur (Şekil 4B).

TARTIŞMA

Bu pilot çalışma, romatoid artrit (RA) patogeneğinde mitokondriyal disfonksiyon, inflamatuvar sitokinler ve

autofajinin belirleyici rolünü pekiştirmekte ve MTX'in bu süreçler üzerindeki faydalı düzenleyici etkilerini ortaya koymaktadır. Altı aylık MTX tedavisi sonrası, DAS28 ve GUS7 skorlarındaki düşüşlerle birlikte CRP, ESH, RF ve anti-CCP gibi başlıca inflamasyon belirteçlerinde önemli bir azalma gözlenerek belirgin bir klinik iyileşme saptanmıştır.

Çalışmamızın dikkat çekici bulgularından biri, MTX tedavisi sonrası bazal oksijen tüketiminde ($p=0,018$) ve ATP üretiminde ($p=0,03$) anlamlı azalma olmasıdır. Bu durum, genel mitokondriyal verimliliğin arttığını veya RA patolojisinde sık görülen mitokondriyal biyoenerjinin kronik aşırı aktivasyonunun azaldığını yansıtabilir. Bu gözlemler, Biniecka ve ark.^[5] sinovyal hücrelerde oksidatif fosforilasyondan glikolize kayma olduğunu ve bunun mitokondriyal reaktif oksijen türlerinde (mtROS) artışa yol açtığını bildirdiği çalışmalarla uyumludur. Ayrıca, Zhou ve ark.,^[4] mtROS'un güçlü NLRP3 (NOD-benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren 3) inflamozom aktivatörleri olduğunu ve RA'da kalıcı inflamasyona katkıda bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, hastalarımızda gözlenen mitokondriyal solunumun normale dönmesi, oksidatif stres ve inflamasyonun kendini sürdüren döngüsünün kırılmasını işaret ediyordur olabilir.

Verilerimiz ayrıca, tedavi sonrası LAMP1 plazma düzeylerinde anlamlı azalma ($p=0,03$), LAMP2 düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış göstermiştir. LAMP1 ve LAMP2, otofagozomların lizozomlarla kaynaşması ve hasar görmüş organellerin, özellikle de bozulmuş mitokondrilerin, yıkımı için gereklidir. RA hastalarının sinovyumunda LAMP1 ve LAMP2 düzeylerinde değişiklikler bildirilmiş olup, bu proteinlerin patolojik autofajiyi kolaylaştırdığı, sinoviyositlerin apoptoza direncini artırdığı ve inflamasyonu sürdürdüğü gösterilmiştir.^[19] Çalışmamızda tedavi sonrası LAMP1 düzeylerindeki düşüş, autofajik akışın normalleşmesine ve hasarlı mitokondrilerin yıkım oranının azalmasına işaret edebilir ve bu da endojen tehlike sinyallerinin kaynağını azaltabilir.

Bu bulgular, Kato ve ark.^[20] LAMP proteinlerinin lizozomal bütünlüğü koruma ve antijen sunumunu modüle etmedeki ikili rolünü vurgulayan gözlemleriyle örtüşmektedir. Ayrıca, Kany ve ark.^[21] tarif ettiği üzere, inflamatuvar koşullarda LAMP'lerin hücre yüzeyindeki ekspresyonundaki değişiklikler bağışıklık hücresi aktivasyonunu ve sitokin üretimini artırabilir. Bulgularımız, MTX tedavisinin lizozomal dengeyi kısmen geri kazandırabileceğini ve RA'daki autofajiye bağlı inflamasyonu azaltabileceğini düşündürmektedir.

MTX tedavisi sonrası YKL-40 düzeylerinde anlamlı azalma ($p=0,0078$) ve IL-1 β ile IL-6 plazma düzeylerindeki düşüş, tedavinin moleküler düzeydeki antiinflamatuvar etkilerini vurgulamaktadır. IL-1 β ve IL-6, RA patogeneğinde merkezi rol

oynayan, sinovyal inflamasyonu, kıkırdak yıkımını ve sistemik belirtileri teşvik eden başlıca sitokinlerdir.^[11] Bu sitokinlerdeki azalma, muhtemelen bağışıklık hücre aktivitesinde azalmayı ve tedavi sonrası iyileşen sinovyal mikroçevreyi yansıtmaktadır.

Doku yeniden şekillenmesi ve kronik inflamasyonla ilişkili bir glikoprotein olan YKL-40, RA hastalığında hastalık aktivitesinin bir biyobelirteci olarak öne sürülmüştür. Tedavi sonrası hasta grubumuzda bu belirteçte gözlenen düşüş, YKL-40 ile RA'daki inflamatuvar yük arasındaki ilişkiyi ortaya koyan önceki çalışmalarla uyumludur.^[22] Ayrıca IL-6'nın Th17 farklılaşmasını teşvik eden ve JAK/STAT3 yolu üzerinden kronik inflamasyonu sürdüren rolü göz önüne alındığında, tedavi sonrası gözlenen bu düşüş, bağışıklık dengesi açısından daha geniş anlamlar taşıyabilir.^[23]

Önemli olarak, çalışmamızda LAMP1 ile bazal solunum ($p=0,022$) ve LAMP2 ile ATP üretimi ($p=0,033$) arasında anlamlı ilişkiler gözlenmiştir. Bu durum, lizozomal-autofajik aktivite ile mitokondriyal biyoenerjetik süreçler arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, özellikle inflamatuvar stres altında, autofajinin mitokondriyal döngü ve fonksiyonu düzenlediğini öne süren Ryter ve ark.^[24] hipotezini desteklemektedir. Ayrıca DAS28 skorlarının proton sızıntısı ile korelasyon göstermesi ($p=0,017$), mitokondriyal membran bütünlüğünün klinik hastalık aktivitesiyle ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, YKL-40 ile IL-6 düzeyleri arasında anlamlı korelasyon ($p=0,035$) saptanmış olup, bu da bu iki belirtecin birlikte düzenlenen inflamatuvar işaretleyiciler olduğunu ve RA patolojisindeki rollerini desteklemektedir.^[12]

MTX tedavisinden sonra LAMP1 ile yedek solunum kapasitesi ($p=0,003$, $r=0,919$) arasında güçlü korelasyon saptanmış, bu durum mitokondriyal rezerv kapasitesindeki iyileşmenin lizozomal fonksiyonun normalleşmesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Ek olarak, GUS7 skoru ile LAMP2 ($p=0,036$, $r=0,677$) ve ESH ile IL-6 ($p=0,05$, $r=0,640$) arasındaki korelasyonlar, klinik inflamasyon ile moleküler bağışıklık aktivitesi arasındaki sıkı ilişkiyi yansıtmaktadır.

Bu korelasyonlar, ölçülen biyobelirteçlerin biyolojik anlamlılığını doğrulamakta ve MTX'in RA aktivitesini mitokondriyal düzenleme, autofaji ve sitokin sinyalleme içeren birbirine bağlı yollar aracılığıyla modüle ettiği kavramını desteklemektedir.

Mitokondriyal disfonksiyon, artmış proinflamatuvar proteinler ve düzensiz autofaji arasındaki etkileşim, RA'da inflamasyon ve doku hasarının kendini sürdüren bir döngüsünü oluşturmaktadır. Çalışmamız, bu karmaşık süreçlerin RA bağlamındaki daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmanın başlıca sınırlılığı, örneklem sayısının küçük olmasıdır ($n=10$); bu durum istatistiksel gücü azaltmakta

ve hem yanlış pozitif (Tip I) hem de yanlış negatif (Tip II) sonuç riskini artırmaktadır. Bununla birlikte, bu araştırma bir pilot çalışma olarak tasarlanmış ve MTX ile tedavi edilen RA hastalarında mitokondriyal disfonksiyon, autofaji ve inflamasyonla ilişkili potansiyel biyobelirteçleri ve eğilimleri tanımlamayı amaçlamıştır. Bu nedenle, elde edilen bulgular ön bulgu ve hipotez oluşturma düzeyinde değerlendirilmelidir; daha büyük ve temsili kohortlarla yapılacak ileri çalışmalarda doğrulanmaları gerekmektedir. Ayrıca, bir kontrol grubunun (tedavi edilmemiş RA hastaları ya da sağlıklı bireyler) bulunmaması, gözlenen değişimlerin yalnızca MTX tedavisine mi yoksa hastalığın doğal seyriyle mi ilgili olduğunu belirlemeyi zorlaştırmaktadır. Ancak, klinik değerlendirme, moleküler belirteçler ve mitokondriyal fonksiyonu birleştiren yaklaşım, RA'daki patogeneze süreçlerine bütüncül bir bakış sunmaktadır. Daha geniş hasta grupları ve uzun süreli takip içeren gelecekteki çalışmalar, tedavi yaklaşımlarının daha iyi sınıflandırılması ve kişiselleştirilmesini sağlayacaktır.

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada MTX tedavisi sonrasında RA hastalarında mitokondriyal fonksiyon parametreleri ile autofaji ve inflamasyonla ilişkili proteinler arasındaki korelasyonlara dair yeni veriler sunulmuştur. Bu pilot bulgular, hastalık şiddetinin izlenmesi ve tedavi yanıtının değerlendirilmesine yönelik gelecekteki klinik uygulamalara zemin hazırlayabilir.

Etik Komite Onayı: Etik komite onayı Plovdiv Tıp Üniversitesi Bilimsel Etik Komitesi'nden alınmıştır (Onay Numarası: 4/08.06.2022, Tarih: 20.06.2022)

Bilgilendirilmiş Onam: Tüm katılımcılardan aydınlatılmış onam alındı.

Çıkar Çatışması: Yazarların beyan edecekleri herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma, Avrupa Birliği–NextGenerationEU tarafından Bulgaristan Cumhuriyeti Ulusal İyileşme ve Dayanıklılık Planı kapsamında yürütülen BG-RRP-2.004-0007-C01 numaralı proje ve Plovdiv Tıp Üniversitesi tarafından desteklenen 15-2025 numaralı proje kapsamında finanse edilmiştir.

Yapay Zekâ Kullanımı: Yazarlar, bu makalenin hazırlanmasında herhangi bir yapay zekâ destekli teknolojinin kullanılmadığını beyan ederler.

Yazar Katkıları: Konsept – M.K., V.S.; Tasarım – V.M., M.K.; Denetim – M.K., V.S.; Kaynak – Z.B., R.K., A.B.; Malzemeler – Z.B., R.K., A.B.; Veri Toplanması ve/veya İşleme – V.M. Z.B., R.K., A.B.; Analiz ve/veya Yorumlama – V.M., M.K., V.S.; Literatür Taraması – V.M.; Yazım – V.M., M.K., V.S.; Eleştirel İnceleme – M.K., V.S.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

KAYNAKLAR

1. Ma C, Wang J, Hong F, Yang S. Mitochondrial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *Biomolecules* 2022;12(9):1216. [\[CrossRef\]](#)
2. Kan S, Duan M, Liu Y, Wang C, Xie J. Role of Mitochondria in Physiology of Chondrocytes and Diseases of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Cartilage* 2021;13(2_suppl):1102S-15. [\[CrossRef\]](#)
3. Zorov D, Juhaszova M, Sollott S. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014;94(3):909-50. [\[CrossRef\]](#)
4. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011;469(7329):221-5. Erratum in: *Nature* 2011;475(7354):122. [\[CrossRef\]](#)
5. Biniecka M, Canavan M, McGarry T, Gao W, McCormick J, Cregan S, et al. Dysregulated bioenergetics: a key regulator of joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 2016;75(12):2192-200. [\[CrossRef\]](#)
6. Terasawa K, Tomabeche Y, Ikeda M, Ehara H, Kukimoto-Niino M, Wakiyama M, et al. Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;479(3):489-95. [\[CrossRef\]](#)
7. Jones S, Mills K, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* 2013;91(3):250-8. [\[CrossRef\]](#)
8. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 2017;36(13):1811-36. [\[CrossRef\]](#)
9. Sarafian V, Jadot M, Foidart J, Letesson J, Van den Brûle F, Castronovo V, et al. Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int J Cancer* 1998;75(1):105-11. [\[CrossRef\]](#)
10. Ge W, Li D, Gao Y, Cao X. The Roles of Lysosomes in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Int Rev Immunol* 2015;34(5):415-31. [\[CrossRef\]](#)
11. Alunno A, Carubbi F, Giacomelli R, Gerli R. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets. *BMC Rheumatol* 2017;1:3. [\[CrossRef\]](#)
12. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6(10):a016295. [\[CrossRef\]](#)
13. Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis* 2011;2011:765624. [\[CrossRef\]](#)
14. Chang M, Chen C, Chiang P, Chiang Y. The Role of Chitinase-3-like Protein-1 (YKL40) in the Therapy of Cancer and Other Chronic-Inflammation-Related Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 2024;17(3):307. [\[CrossRef\]](#)

15. Kazakova MH, Batalov AZ, Mateva NG, Kolarov ZG, Sarafian VS. YKL-40 and cytokines - a New Diagnostic Constellation in Rheumatoid Arthritis? *Folia Med (Plovdiv)* 2017;59(1):37-42. [\[CrossRef\]](#)
16. Prevoo M, van 't Hof M, Kuper H, van Leeuwen M, van de Putte L, van Riel P. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38(1):44-8. [\[CrossRef\]](#)
17. Backhaus M, Ohrndorf S, Kellner H, Strunk J, Backhaus TM, Hartung W, et al. Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practice: a pilot project. *Arthritis Rheum* 2009;61(9):1194-201. [\[CrossRef\]](#)
18. Bruyn GA, Iagnocco A, Naredo E, Balint PV, Gutierrez M, Hammer HB, et al. OMERACT Ultrasound Working Group. OMERACT Definitions for Ultrasonographic Pathologies and Elementary Lesions of Rheumatic Disorders 15 Years On. *J Rheumatol* 2019;46(10):1388-93. [\[CrossRef\]](#)
19. Zhu L, Wang H, Wu Y, He Z, Qin Y, Shen Q. The Autophagy Level Is Increased in the Synovial Tissues of Patients with Active Rheumatoid Arthritis and Is Correlated with Disease Severity. *Mediators Inflamm* 2017;2017:7623145. [\[CrossRef\]](#)
20. Kato M, Ospelt C, Gay RE, Gay S, Klein K. Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(1):40-8. [\[CrossRef\]](#)
21. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci* 2019;20(23):6008. [\[CrossRef\]](#)
22. Väänänen T, Vuolteenaho K, Kautiainen H, Nieminen R, Möttönen T, Hannonen P, et al. NEO-RACo Study Group. Glycoprotein YKL-40: A potential biomarker of disease activity in rheumatoid arthritis during intensive treatment with csDMARDs and infliximab. Evidence from the randomised controlled NEO-RACo trial. *PLoS One* 2017;12(8):e0183294. [\[CrossRef\]](#)
23. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol* 2021;33(3):127-48. [\[CrossRef\]](#)
24. Ryter S, Cloonan S, Choi A. Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells* 2013;36(1):7-16. [\[CrossRef\]](#)