

# Romatoid Artrit Hastalarında Serum Orosomukoid-1 (ORM1) Seviyeleri ve ORM1 Gen Promotörünün Metilasyonu Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

## Investigation of the Relationship Between Serum Orosomucoid-1 (ORM1) Levels and Methylation of ORM1 Gene Promoter in Patients with Rheumatoid Arthritis

<sup>id</sup> Zülfinaz Betül ÇELİK<sup>a</sup>, <sup>id</sup> Caner GÜNAYDIN<sup>b</sup>, <sup>id</sup> A. Kıvanç CENGİZ<sup>c</sup>, <sup>id</sup> Şengül TURAL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Samsun, TÜRKİYE

<sup>b</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji ABD, Samsun, TÜRKİYE

<sup>c</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Romatoloji BD, Samsun, TÜRKİYE

**ÖZET Amaç:** Romatoid artrit (RA), patogenezinde genetik ve epigenetik faktörlerin etkili olduğu kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Orosomukoid-1 (ORM1), antiinflamatuvar özelliğe sahip olan bir akut faz yanıt proteinidir ve yapılan çalışmalarda RA patogenezini ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak hastalığındaki rolü tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada, RA hastalarında ve sağlıklı kontrollerde serum ORM1 düzeylerinin ve ORM1 gen promotörü metilasyonunun araştırılması amaçlandı. **Gereç ve Yöntemler:** Klinik olarak RA teşhisi olan 40 hasta ve 31 sağlıklı kontrol çalışmaya dâhil edildi. Tüm donörlere ait periferik kan örneklerindeki serum ORM1 seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Aynı bireyler için kandan DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA örneklerine bisülfid modifikasyonu yapıldı. ORM1 gen promotörü için tasarlanan metilasyon spesifik primerler kullanılarak, ORM1 geni promotör metilasyon profilleri, metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu metodu ile belirlendi. **Bulgular:** Serum ORM1 seviyesinin, kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla yaklaşık 3,2 kat yüksek olduğu gözlemlendi ( $p<0,001$ ). ORM1 gen promotörünün RA hastalarındaki metilasyon sıklığı %70, kontrol grubunda ise %35,5 olarak belirlendi. Hasta grubunda, ORM1 promotöründe hipermetilasyon, kontrol grubunda ise hipometilasyon olduğu tespit edildi. **Sonuç:** Antiinflamatuvar bir akut faz proteini olan ORM1'in serum seviyelerinin, hasta grubunda kontrolden çok daha az olması ORM1'in metilasyonunun, gen ifadesinin düzenlenmesinde ve inflamatuvar yanıtta önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Epigenetik değişiklikler, RA'nın klinik belirtilerinin başlamasından önce meydana geldiği için ORM1'in metilasyon durumu RA için klinik bir biyobelirteç olabilir.

**ABSTRACT Objective:** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease, and genetic and environmental factors are well-known causes. Orosomucoid-1 (ORM1) is an acute phase response protein with anti-inflammatory properties and associated with the RA pathogenesis. However, its role in RA has not been fully known. In this study, we aimed to investigate serum ORM1 levels and methylation of ORM1 gene promoter in RA patients and healthy controls. **Material and Methods:** The study group consisted of 40 RA patients and 31 healthy controls. Serum levels of ORM1 in RA patients and healthy controls were determined by using the ELISA method. After genomic DNA was isolated from blood samples, DNA samples were modified with bisulfite. Promoter methylation of ORM1 was analyzed by methylation-specific PCR using methylation-specific primers designed for the ORM1 promoter region. **Results:** The serum levels of ORM1 in control group were found approximately 3.2 times higher compared to the patient group ( $p<0.001$ ). The frequency of methylation of the ORM1 gene promoter was 70% in RA patients and 35.5% in the control group. Consequently, hypermethylation for RA patients and hypomethylation for the control group were observed in the ORM1 promoter. **Conclusion:** The serum levels of ORM1 are much lower in the patient group than the control, suggesting that methylation of ORM1 promoter plays an essential role in regulating gene expression and in the inflammatory response. Since epigenetic changes occur before the onset of clinical signs of RA, the methylation status of ORM1 might be a clinical biomarker for RA.

**Anahtar Kelimeler:** Artrit, romatoid; orosomukoid; DNA metilasyonu

**Keywords:** Arthritis, rheumatoid; orosomucoid; DNA methylation

**Correspondence:** Zülfinaz Betül ÇELİK  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Samsun, TÜRKİYE/TURKEY  
**E-mail:** betul.celik@omu.edu.tr



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

**Received:** 13 Mar 2020

**Received in revised form:** 22 Jul 2020

**Accepted:** 17 Sep 2020

**Available online:** 14 Dec 2020

2146-9040 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Romatoid artrit (RA) otoimmün bir kronik inflamatuvar eklem hastalığıdır.<sup>1</sup> RA; sinoviyal hiperplazi, eklemlerde şişkinlik, ağrı, inflamasyon, kıkırdak ve sinoviyal membranda hasar gibi çok sayıda semptomla karakterizedir. RA'da, yüksek düzeyde proinflamatuvar sitokin üreten aktif bağışıklık sistemi hücreleri, kan dolaşımından sinoviyal membran veya sinoviyal sıvıya göç eder ve sonuç olarak eklem kıkırdağında aşamalı erozyona yol açar.<sup>2</sup> Proinflamatuvar sitokin üretiminin yanı sıra T hücreleri, apoptoza dirençli fibroblast benzeri sinoviyositleri (FLS) de aktive eder. FLS'ler, sinoviyumdaki esas efektör hücreler olup, RA'daki kıkırdak ve kemik degradasyonunun temel sebebidir.<sup>3</sup> RA, dünya çapında popülasyonun %1'ini etkiler ve etiyojisi tam olarak bilinmemektedir, ancak hem genetik yatkınlığın hem de çok sayıda çevresel bileşenin etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır.<sup>4</sup> Günümüzde, romatizmal hastalıkların tamamen iyileştirilmesi için uygulanabilecek bir tedavi bulunmamaktadır. Mevcut tedavilerin en önemli hedefi eklemlerdeki inflamasyon, ağrı ve şişkinliği azaltarak, meydana gelebilecek hasarı en aza indirmektir.<sup>5</sup>

Bağışıklık sistemi elemanlarının epigenetik regülasyonunun, otoimmün hastalıkların başlangıcında ve progresyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca DNA metilasyon profilindeki değişimlerin, RA patogeneziyle ilişkili olduğu da gösterilmiştir.<sup>6</sup> DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonlar, DNA sekansında herhangi bir değişim olmaksızın gen ifadesinde değişiklik yapabilen ve geri dönüştürülebilir değişimlerdir.<sup>7</sup> DNA metilasyonu, genomda çoğunlukla Sitozin-fosfat-Guanin (CpG) dinükleotitlerindeki sitozinlerde meydana gelir. İnsan genomundaki CpG'lerin büyük çoğunluğu ise gen promotörlerinde bulunmaktadır, böylece gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.<sup>8</sup> Genom çaplı DNA metilasyon profili çalışmalarında RA'da, periferik kan mononükleer hücrelerinde ve FLS'lerde global DNA hipometilasyonu olduğu tespit edilmiştir. Hipometile olan bölgelerin çoğunun da RA patogeneziyle ilişkili mekanizmalarda rol alan genlerde olduğu belirtilmiştir.<sup>9</sup>

Dokularda inflamasyon meydana geldiğinde, normal fonksiyonel durumun tekrar sağlanabilmesi ve hücre hasarının önlenmesi için hızlı bir yanıt

oluşur. Bu hızlı reaksiyon, akut faz yanıtı olarak adlandırılır ve bu reaksiyonlara, primer olarak inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olan makrofajlar aracılık eder.<sup>10</sup> Akut faz yanıtı sırasında bu inflamatuvar sitokinler, akut faz proteinleri olarak bilinen moleküllerin sistemik olarak üretimine neden olurlar. Bu akut faz proteinleri memelilerde korunmuş olup, CRP, orosomukoid-1 (ORM1) (aynı zamanda  $\alpha$ -1-asit glukoprotein olarak da adlandırılır. Haptoglobin ve fibrinojen bunlara örnek verilebilir proteinlerdir.).<sup>11</sup> ORM1, 41-43 kDa'lık bir glikoproteindir ve yüksek oranda glikozillenmiş bir serum proteinidir. ORM1, insandaki majör akut faz proteinlerindedir ve akut faz yanıtındaki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen immünmodülatör ve antiinflamatuvar özellikleri olduğu gösterilmiştir.<sup>12</sup> Bazı akut faz proteinleri negatif feedback oluştururlar, ORM1'de bunlardan biri olup nötrofil kemotaksisini, lenfosit proliferasyonunu ve trombosit agregasyonunu inhibe eder.<sup>13</sup> ORM1, esas olarak karaciğerden üretilen bir glikoproteindir ve RA gibi patolojik ve fizyolojik durumlarda üretimi ve glikozilasyonunda değişimler meydana gelir. İnflamasyon durumunda fukozilasyonda bir artış olur ve adezyon molekülü E-selektine bağlanmayı inhibe eder, bunun sonucunda da lökosit adezyonunu ve migrasyonunu bloke eder, böylece güçlü bir antiinflamatuvar etki gösterir.<sup>14</sup>

RA patogeneziinde etkili olan moleküler mekanizmaların anlaşılması, hem hastalığın erken aşamalarda teşhis edilebilmesi hem de geliştirilecek tedaviler için yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi için gereklidir. İnflamatuvar biyobelirteçler de kronik inflamatuvar hastalıkların patogenetizini aydınlatmak ve hastalık aktivitesini gözlemek açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada, RA patogenezi için önemli akut faz proteinlerinden biri olan ORM1'in, RA'daki rolünü araştırmak amacıyla RA hastaları ve sağlıklı kontrollerde ORM1 serum seviyeleri ve *ORM1* gen promotörünün metilasyonunun ORM1 serum seviyesi ile ilişkisi araştırıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### ÇALIŞMA GRUBU

“Amerikan Romatizma Derneği/Avrupa Romatizma Birliği 2010” sınıflandırma kriterlerine göre RA ta-

nısı almış hastalar çalışmaya dâhil edildi.<sup>15</sup> Hastaların demografik ve klinik bilgileri muayene sırasında alındı. Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun (KA EK) 15.11.2016 tarihli ve OMÜ KA EK 2016/300 no.lu etik kurul kararıyla onaylandı ve çalışmada uygulanan tüm prosedürler Helsinki Deklarasyonu 2008 Prensipleri'ne göre gerçekleştirildi. Tüm gönüllü bireyler çalışma hakkında bilgilendirildi ve imzalı onayları alındı. RA tanılı olan 40 (30 kadın, 10 erkek) hasta (ortalama yaş 50,39±10,5 yıl) ve RA ya da başka bir otoimmün hastalık öyküsü olmayan 31 (27 kadın, 4 erkek) sağlıklı kontrol (ortalama yaş 37,84±10,9 yıl) olmak üzere toplam 71 gönüllü çalışmaya dâhil edildi.

RA hastalık aktivitesi, 28 eklem (şiş eklem sayısı ve hassasiyet), romatoid faktör (RF), eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve C-reaktif protein (CRP) e dayanarak belirlenen DAS28 skoruna göre değerlendirildi. DAS28 skorun değerlendirmesine göre; 2,6-3,2 düşük, >3,2≤5,1 orta, ve >5,1 yüksek hastalık aktivitesini göstermektedir.

#### SERUM OROSOMUKOİD-1 SEVİYELERİNİN ÖLÇÜMÜ

Serum ORM1 seviyeleri, üretici firmanın protokolü uygulanarak piyasada ticari olarak bulunan Orosomucoid-1 ELISA Kit (#MBS901995, Hangzhou East-biopharm, Çin) ile mikrolate cihazında ELISA yöntemi ile tayin edildi (Assay range: 0,05 ng/mL-10 ng/mL).

#### PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU

Hasta ve kontrollere ait periferik kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı. Periferik kan mononükleer hücrelerinden genomik DNA'lar, "Pure Link® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, ABD)" kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre izole edildi. DNA kon-

santrasyonları ve saflıkları NanoDrop spektro- fotometre (Jenway Genova Nano, İngiltere) ile belirlendi.

#### BİSÜLFİT MODİFİKASYONU VE METİLYASYON-SPEFİK PCR

DNA örneklerinin bisülfitle modifikasyonu "EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)" ile 500 ng/20 mL DNA kullanılarak ve kitin protokolü doğrultusunda yapıldı. Metilasyon-spesifik PCR (MSP) için, *ORM1* gen promotör bölgesine özgül metile ve unmetile primerler kullanıldı. MSP primerleri, *ORM1* promotör dizisi ve "http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi" veritabanı kullanılarak tasarlandı. Primer dizileri Tablo 1'de verilmiştir.

MSP reaksiyonu toplam 25 µl hacimde, bisülfitle modifiye edilmiş 3 µl DNA, Taq™ DNA Polimeraz enzimi (Thermo Fisher Scientific, Litvanya) ve spesifik primerler kullanılarak yapıldı. *ORM1* MSP/USP PCR reaksiyonu, Thermal Cycler Gene-Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, ABD) ile: 95 °C'de 3 dk başlangıç denatürasyonunu takiben 40 döngü olarak 95 °C'de 40 sn, 57 °C'de 40 sn, 72 °C'de 70 sn, 72 °C'de 7 dk son uzama ve 4 °C'de muhafaza edilmek üzere gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak "Cells-to-CpG™ Methylated and Unmethylated gDNA Controls (Applied Biosystems, ABD)" kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi ile yürütülen PCR ürünleri bir UV transillüminatörü ile görüntüledi. Analiz sonucunda, yalnızca metile veya hem metile hem unmetile spesifik primerle yapılan reaksiyonda ürün tespit edildiğinde, gen metilasyon durumu metile olarak değerlendirildi. Yalnızca unmetile spesifik primerle yapılan reaksiyonda PCR ürünü gözlemlendiğinde ise metilasyon durumu unmetile olarak değerlendirildi.

**TABLO 1:** MSP primer dizileri, hibridizasyon sıcaklıkları (Tm) ve beklenen ampikon uzunlukları.

Primer adı	Primer sekansı(5'-3')	Baz sayısı	Tm (°C)	Ampikon uzunluğu (bp)
ORM1 MSP-F	TTAGGAAATTTGTGGATTATACGT	25	57	195
ORM1 MSP-R	CTACCAACACTTAAAAATACCTCG	25	57	195
ORM1 USP-F	TTTTTTTAGGAAATTTGTGGATTATAT	28	58	201
ORM1 USP-R	CCTACCAACACTTAAAAATACCTCAC	27	59	201

ORM1: Orosomukoid-1; MSP-F: Metilasyona özgül forward primer; MSP-R: Metilasyona özgül reverse primer; USP-F: Metilasyona özgül olmayan forward primer; USP-R: Metilasyona özgül olmayan reverse primer; bp: Baz çifti.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen veriler SPSS V.22 ile analiz edildi. Verilerin normal dağılımını test etmek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarının metilasyon sıklıklarının karşılaştırılması için ki-kare ( $\chi^2$ ) testi yapıldı. Değişkenler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde Pearson ve Spearman korelasyon katsayısı kullanıldı. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında bağımsız gruplar t-testi uygulandı. Betimleyici istatistik olarak, normal dağılım gösteren veriler ortalama±standart sapma, normal dağılmayan veriler medyan (minimum–maksimum), kategorik değişkenler ise örneklem sayısı ve yüzde olarak verildi. Tüm istatistiksel testlerde 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

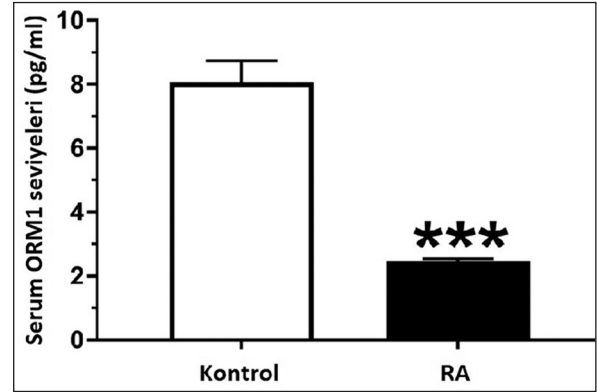
### KLİNİK PARAMETRELER

Hasta grubunda, ESR ve DAS28 arasında pozitif korelasyon bulundu ( $r=0,578$ ,  $p=0,005$ ). Yüksek ESR değerine sahip bireylerde hastalık aktivitesinin de yüksek olduğu tespit edildi. CRP ( $r=0,239$ ,  $p=0,456$ ), RF ( $r=0,232$ ,  $p=0,365$ ) ve antisisitrüline protein antikorları ( $r=0,237$ ,  $p=0,091$ ) değerleri ile hastalık aktivitesi skoru DAS28 arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı. RA hasta grubunun demografik özellikleri ve klinik verileri Tablo 2'de verilmiştir.

**TABLO 2:** RA hastalarının demografik ve klinik verileri.

	RA (n=40)
Yaş (yıl)	50,39±10,5
Cinsiyet	Kadın/erkek (30/10)
ESR (mm/h)	29,12±18,5
CRP (mg/L), medyan (minimum–maksimum)	3,73 (0,07-59)
RF pozitif	%67,4
ACPA pozitif	%73,5
Hastalık süresi (yıl)	9,08±7,38
DAS28 skoru	3,98±1,35
İlaçlar	
DMARD naive	11 (%27,5)
MTX + NSAİİ +Steroid +/- Anti-TNF	29 (%72,5)

Veriler ortalama±standart sapma, sayı, yüzde veya medyan olarak verilmiştir. ESR: Eritrosit sedimentasyon oranı; CRP: C-reaktif protein; ACPA: anticyclic citrullinated peptide antibodies; RF: romatoid faktör; DAS28: hastalık aktivitesi skoru; DMARD: hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç; MTX: methotrexate; NSAİİ: nonsteroid anti-inflamatuar ilaç; Anti-TNF: Tümör nekrozis faktör-alfa inhibitörü ilaç.



**ŞEKİL 1:** Romatoid artrit hasta grubu ve kontrol grubunun serum ORM1 seviyeleri (\*\*p<0,001). Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi.

### SERUM OROSOMUKOİD-1 SEVİYELERİ

Serum ORM1 seviyelerinin kontrol grubunda (n=31; 8,06±3,49 pg/mL), hasta grubuna (n=40; 2,48±0,43 pg/mL) göre anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ). Serum seviyelerini gösteren grafik Şekil 1'de verilmiştir.

### HASTA VE KONTROL GRUBUNDA OROSOMUKOİD-1 METİLYASYON FREKANSLARI

Toplam 40 RA hastası ve 31 sağlıklı kontrole ait periferik kan örneklerinde, *ORM1* geninin promotör metilasyon analizi yapıldı. Hasta grubunda *ORM1* için metilasyon sıklığı %70 (28/40), kontrol grubunda %35,5 (11/31) olarak bulundu (Tablo 3). *ORM1* promotör metilasyonları açısından hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ( $p=0,004$ ).

Hasta ve kontrol grubundaki ORM1 serum seviyeleri ve *ORM1* promotör metilasyon profili değerlendirildiğinde, serum seviyeleri ile metilasyon durumu arasında bir ilişki olduğu tespit edildi. Hasta ve kontrol grubunda *ORM1* promotörü metile veya unmetile olanlardaki serum ORM1 seviyeleri Tablo 4'te verilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda promotör metilasyon sıklığı ve ORM1 serum seviyeleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 2'de verilmiştir. ORM1 serum seviyesinin yüksek olduğu kontrol grubunda, metilasyon sıklığının düşük olduğu gözlemlendi. Promotör metilasyon derecesinin azalması ya da unmetile olması *ORM1* gen ifadesinin artmasına neden olmuştur. Hasta grubundaki hipermetilasyon ise gen ifadesinin ve serum seviyelerinin azalmasına neden

**TABLO 3:** Hasta ve kontrol grubunda ORM1 promotör bölge metilasyon frekansları.

	Metile ORM1	Unmetile ORM1	p değeri
	n (%)	n (%)	
Hasta (n=40)	28 (%70)	12 (%30)	0,004
Kontrol (n=31)	11 (%35,5)	20 (%64,5)	

**TABLO 4:** Hasta ve kontrol grubunda ORM1 promotörü metile veya unmetile olanlardaki serum ORM1 seviyeleri.

	Kontrol ORM1	Hasta ORM1	p değeri
	Ortalama±SS (n)	Ortalama±SS (n)	
Metile	4,42±1,95 pg/mL (11)	4,15±3,4 pg/mL (28)	0,985
Unmetile	11,29±1,32 pg/mL (20)	7,1±2,19 pg/mL (12)	**0,009

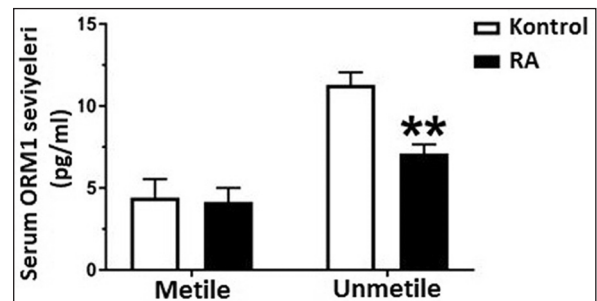
olmuştur. RA ve kontrol grubuna ait DNA örneklerinde *ORM1* geni için MSP sonuçlarının agaroz jel elektroforezi görüntüleri ise Şekil 3'te verilmiştir.

## TARTIŞMA

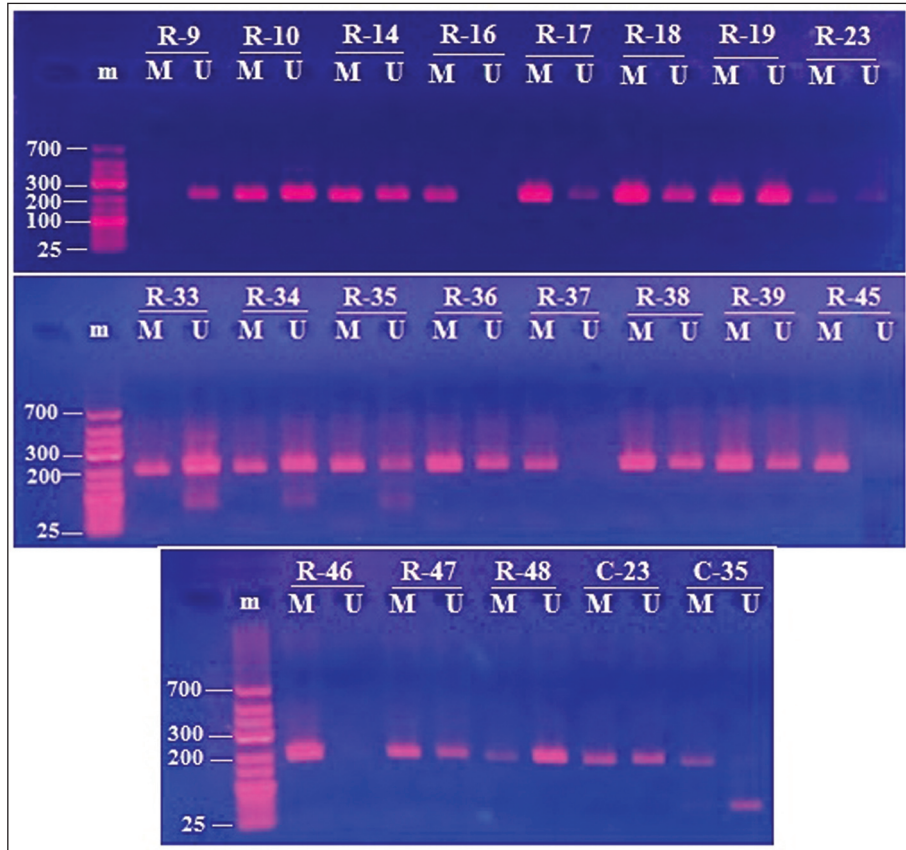
ORM1; plazmada bol miktarda bulunan, yaralanma, enfeksiyon ve inflamasyon gibi stres sinyalleri ile ekspresyonu artan bir akut faz proteindir ve immün-modülatör olarak etki gösterir.<sup>16</sup> Her ne kadar patolojik süreçlerdeki etki mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da ORM1, doğal bir antiinflamatuvar ajan olarak görülmektedir, bunun nedeni ise nötrofil aktivasyonunu inhibe etmesi ve monositlerden proinflamatuvar sitokin üretimini engellemesidir.<sup>17</sup> ORM1'in, bağışıklık sisteminin temel bileşenleri olan makrofaj ve monositler üzerine olan düzenleyici rolü otoimmün ve inflamatuvar hastalıklardaki önemini de göstermektedir. Akut faz proteinleri ve bunlardan biri olan ORM1, karaciğer enzimleri tarafından yüksek oranda glikozillendiği için oldukça stabildir. Bu nedenle, inflamasyonun değerlendirilmesi için ideal biyobelirteç olabilecek özelliktedir.<sup>18</sup> ORM1'in antiinflamatuvar özellikte olduğu bilinmesine rağmen RA ile ilişkisi ve gen ifadesinin nasıl düzenlendiği tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada ORM1'in, doğal immünmodülatör ve antiinflamatuvar özellikleri göz önüne alınarak, RA hastalarında ve sağlıklı kontrollerde serum ORM1 seviyeleri ve *ORM1* gen promotörünün metilasyon profili arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı.

Bu çalışmanın sonucunda, serum ORM1 seviyelerinin kontrol grubunda RA hasta grubundan daha yüksek olduğu tespit edildi. Hasta grubunda serum ORM1 seviyesinin daha düşük olmasının, kronik inflamasyon nedeniyle gen ifadesinin azalmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca serum seviyelerinin metilasyon profiliyle de ilişkili olduğu görüldü. Kontrol grubunda, serum ORM1 seviyesinin yüksek olduğu ve metilasyon sıklığının düşük olduğu gözlemlendi. Serum ORM1 seviyesinin düşük olduğu RA grubunda ise *ORM1* gen promotöründe metilasyon sıklığının fazla olduğu gözlemlendi. Bu bulgular RA'da, ORM1'in bir antiinflamatuvar akut faz proteini olarak etkili olduğunu ve inflamasyon durumunda gen ifadesinin azaldığını göstermektedir. Ayrıca *ORM1* gen promotörünün hipermetilasyonunun, gen ifadesinin susturulmasına ve serum seviyesinin azalmasına neden olduğunu düşünülmektedir.

ORM1'in etki mekanizması üzerine daha önce farklı gruplar tarafından yapılmış çalışmalarda, inflamasyonla ve RA ile ilişkisi üzerine farklı sonuçlar elde edilmiştir. Lacki ve ark.nın erken evre RA'da akut faz yanıtı üzerine yaptıkları çalışmada, serum ORM1 seviyesinin, hastalığın başlangıç evresinde sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğunu tespit etmiştir. Hastalığın başlangıcından 3 yıl sonra ise serum ORM1 seviyesinde önemli bir azalma olduğunu, ancak bu azalmanın yalnızca anatomik progresyonu olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.<sup>19</sup> Çalışmamızdaki hastaların, hastalık sürelerinin ortalama 9 yıl olduğu düşünüldüğünde, hasta grubunda kontrole göre serum ORM1 seviyesinin düşük olması bu çalışmayla benzerlik gösterebilir. Bulgularımızdan farklı olarak, bir Japon popülasyo-



ŞEKİL 2: ORM1 promotör metilasyonu ile ORM1 serum seviyeleri arasındaki ilişki (\*\*p=0,009). Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi.



**ŞEKİL 3:** ORM1 geni promotör bölge metilasyonunun hasta ve kontrollerdeki agaroz jel görüntüleri (m: Marker (baz çifti); M: Metile; U: Unmetile; R: RA hasta grubu; C: sağlıklı kontrol grubu).

nunda, kronik inflamatuvar hastalıklar olarak RA ve sistemik lupus eritematozusta, serum ORM1 seviyeleri araştırılmış ve bu 2 hastalıktaki relatif konsantrasyonun sağlıklı kontrollerden önemli derecede yüksek olduğu bildirilmiştir.<sup>20</sup> Bulgulardaki bu farklılıkta, çalışmamızın Türk popülasyonunda yapılmış olmasının ve dolayısıyla farklı epigenetik faktörlerin etkisinin olabileceği düşünülebilir. ORM1'in vitamin D<sub>3</sub> ve immün sistemin regülasyonu ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada ise ORM1 geni susturulduğunda, interlökin-6 ve tümör nekrozis faktör-alfa gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir.<sup>21</sup> Yapılan bu çalışma, çalışmamızda olduğu gibi ORM1'in antiinflamatuvar ve immünmodülatör özelliğini desteklemektedir. Ayrıca ORM1'in, RA'da akut faz yanıtındaki rolünü ve hangi mekanizmalarla düzenlendiğini aydınlatmak amacıyla yapmış olduğumuz bu çalışmada, ilk defa *ORM1*'in promotör metilasyonu araştırıldı ve serum seviyelerindeki artı-

şın, *ORM1* promotör metilasyon sıklığıyla önemli derecede ilişkili olduğu gösterildi.

## SONUÇ

Çalışmamızda, RA hastalarında serum ORM1 seviyelerinin sağlıklı kontrollerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra RA hastalarında, *ORM1* gen promotöründe hipermetilasyon olduğu ve sağlıklı kontrollerde ise hipometilasyon olduğu gözlenmiştir. RA hastalarında *ORM1* ekspresyonunun azalmasından, gen promotörün aşırı metilasyonunun sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Kronik inflamatuvar hastalıklar, hem genetik hem de epigenetik faktörlerin etkili olduğu kompleks hastalıklardır. Metilasyon gibi epigenetik modifikasyonlar ise geri dönüştürülebilir değişimlerdir. Hastalık patogenezinde önemli etkisi olan biyolojik hedeflerin belirlenmesi, hem tedaviye yönelik ilaç geliştirilmesi hem de hastalığın aktivitesinin gözlenmesi ve değerlendirilmesi için önemlidir.

rilmesi açısından biyobelirteç olarak önem taşımaktadır. Bu çalışmanın bulguları göz önüne alındığında ORM1'in, serum düzeylerinin ve gen promotörü metilasyon durumunun, RA hastalığı için klinik bir biyobelirteç olabileceğini düşünüyoruz.

### Etik Kurul Onayı

Bu araştırma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (KAEK) 15.11.2016 tarihli ve OMÜ KAEK 2016/300 nolu etik kurul kararıyla onaylanmıştır.

### Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

### Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

### Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Zülfinaz Betül Çelik, Caner Günaydın; **Tasarım:** Zülfinaz Betül Çelik, Caner Günaydın; **Denetleme/Danışmanlık:** Zülfinaz Betül Çelik, Caner Günaydın, Şengül Tural; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** A. Kıvanç Cengiz, Zülfinaz Betül Çelik, Caner Günaydın; **Analiz ve/veya Yorum:** Caner Günaydın, Zülfinaz Betül Çelik; **Kaynak Taraması:** Zülfinaz Betül Çelik, Caner Günaydın; **Makalenin Yazımı:** Zülfinaz Betül Çelik, Caner Günaydın; **Eleştirel İnceleme:** Şengül Tural, Caner Günaydın; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Zülfinaz Betül Çelik, Caner Günaydın; **Malzemeler:** A. Kıvanç Cengiz, Zülfinaz Betül Çelik.

## KAYNAKLAR

- Hu X, Tang J, Hu X, Bao P, Deng W, Wu J, et al. Silencing of long non-coding RNA HOTTIP reduces inflammation in rheumatoid arthritis by demethylation of SFRP1. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;19:468-81. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Haleagrahara N, Hodgson K, Miranda-Hernandez S, Hughes S, Kulur AB, Ketheesan N, et al. Flavonoid quercetin-methotrexate combination inhibits inflammatory mediators and matrix metalloproteinase expression, providing protection to joints in collagen-induced arthritis. *Inflammopharmacology*. 2018;26(5):1219-32. [Crossref] [PubMed]
- Ciechomska M, Roszkowski L, Maslinski W. DNA Methylation as a future therapeutic and diagnostic target in rheumatoid arthritis. *Cells*. 2019;8(9):953. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3(Suppl3):S265-72. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review. *JAMA*. 2018;320(13):1360-72. [Crossref] [PubMed]
- Julià A, Absher D, López-Lasanta M, Palau N, Pluma A, Waite Jones L, et al. Epigenome-wide association study of rheumatoid arthritis identifies differentially methylated loci in B cells. *Hum Mol Genet*. 2017;26(14):2803-11. [Crossref] [PubMed]
- Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007;447(7143):396-8. [Crossref] [PubMed]
- Hua XM, Wang J, Qian DM, Song JY, Chen H, Zhu XL, et al. DNA methylation level of promoter region of activating transcription factor 5 in glioma. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2015;16(9):757-62. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Liu CC, Fang TJ, Ou TT, Wu CC, LiRN, Lin YC, et al. Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2011;135(1-2):96-9. [Crossref] [PubMed]
- Ligresti G, Aplin AC, Dunn BE, Morishita A, Nicosia RF. The acute phase reactant orosomucoid-1 is a bimodal regulator of angiogenesis with time- and context-dependent inhibitory and stimulatory properties. *PLoS One*. 2012;7(8):e41387. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med*. 2009;59(6):517-26. [PubMed] [PMC]
- Lin Y, Rajala MW, Berger JP, Moller DE, Barzilai N, Scherer PE, et al. Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42077-83. [Crossref] [PubMed]
- Lainé E, Couderc R, Roch-Arveiller M, Vasson MP, Giroud JP, Raichvarg D, et al. Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by alpha 1-acid glycoprotein. *Inflammation*. 1990;14(1):1-9. [Crossref] [PubMed]
- Smith KD, Pollacchi A, Field M, Watson J. The heterogeneity of the glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein between the sera and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Biomed Chromatogr*. 2002;16(4):261-6. [Crossref] [PubMed]
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Feldson DT, Clifton O, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569-81. [Crossref] [PubMed]
- Cecilian F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2007;8(1):91-108. [Crossref] [PubMed]
- Hochebied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(1):25-34. [Crossref] [PubMed]
- Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1805-12. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Lacki JK, Porawska W, Mackiewicz SH, Muller W. Acute-phase response in early refractory rheumatoid arthritis: long-term follow-up study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1994;4(4):168-71. [PubMed]
- Hanada K, Yamanaka E, Yamamoto N, Minami H, Kawai S, Sasaki Y, et al. Effects of surgery and chronic disease states on the concentrations and phenotype distribution of alpha1-acid glycoprotein: studies in patients with breast cancer and patients with chronic inflammatory disease. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2011;49(7):415-21. [Crossref] [PubMed]
- Gemelli C, Martello A, Montanari M, Zanocco Marani T, Salsi V, Zappavigna V, et al. The orosomucoid 1 protein is involved in the vitamin D-mediated macrophage de-activation process. *Exp Cell Res*. 2013;319(20):3201-13. [Crossref] [PubMed]