



**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ OLAN ÇOCUKLARDA NÖTROFİL
EKSRASELLÜLER TUZAKLARI VARLIĞININ VE ALFA 1 ANTİTRİPSİN
AKUT FAZ REAKTANI SERUM DÜZEYLERİNİN HASTALIK KLİNİĞİ
İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hatice Kibriya FİDAN

**DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2024

Hatice Kibriya Fidan tarafından hazırlanan “AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ OLAN ÇOCUKLARDA NÖTROFİL EKSTARASELLÜLER TUZAKLARI VARLIĞININ VE ALFA 1 ANTİTRİPSİN AKUT FAZ REAKTANI SERUM DÜZEYLERİNİN HASTALIK KLİNİĞİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül ATAĞ YÜCEL

İmmünoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

.....

Başkan: Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

İmmünoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Vedat Bulut

İmmünoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Resul KARAKUŞ

İmmünoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Sıdıka Esra BASKIN

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Başkent Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Yelda BİLGİNER

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 24/12/2024

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Saniye BİLİCİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hatice Kibriya FİDAN

24/12/2024

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ OLAN ÇOCUKLARDA NÖTROFİL EKSRASELLÜLER
TUZAKLARI VARLIĞININ VE ALFA 1 ANTİTRİPSİN AKUT FAZ REAKTANI
SERUM DÜZEYLERİNİN HASTALIK KLİNİĞİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Hatice Kibriya FİDAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2024

ÖZET

Bu çalışmada, çocukluk çağında görülen Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) hastalığında nötrofil ekstrasellüler tuzak (NET) oluşumu ve Alfa-1 Antitripsin (AAT) düzeyleri ile hastalık kliniği arasındaki ilişki incelenmiştir. Araştırmanın amacı, NET ve AAT düzeylerinin AAA'nın farklı klinik gruplarında nasıl bir rol oynadığını anlamak ve hastalığın yönetiminde yeni tedavi stratejilerine ışık tutmaktır. Çalışma kapsamında, kontrol grubu ve remisyon, ateş, plörit, peritonit ve artrit gibi farklı klinik durumlara sahip hasta gruplarındaki NET oluşumu ve AAT düzeyleri analiz edilmiştir. Bu analizler, yaş, cinsiyet ve genetik mutasyon (özellikle M694V mutasyonu) gibi değişkenlerle ilişkilendirilmiştir. Araştırma bulgularına göre, yaş ve cinsiyet ile AAA hastalığı arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Peritonit grubunda beyaz kan hücresi sayıları diğer gruplara kıyasla daha yüksek bulunurken, nötrofil (NEU) yüzdesi (%) ve NEU sayısı ($10^3/uL$) tüm gruplarda benzerlik göstermiştir. Ancak NEU değerleri arttıkça NET oluşumunun da arttığı görülmüştür. Ayrıca, plörit grubunun AAT düzeyleri diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir. NET oluşumu ile AAT düzeyleri arasında ise güçlü bir istatistiksel ilişki saptanmıştır. Buna göre, AAT seviyelerindeki artış NET formasyonu ile doğrudan ilişkilidir. M694V mutasyonu varlığında, NET ölçümleri kontrol grubuna kıyasla daha yüksek ortalamalar göstermiştir. Bununla birlikte, AAT düzeyleri mutasyon varlığına göre istatistiksel bir fark göstermemiştir. Bu bulgular, AAA hastalığında NET oluşumu ve AAT düzeylerinin önemli bir etkileşim içinde olduğunu ve bu etkileşimin hastalığın patogeneğinde kritik bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Araştırmanın sonuçları, AAA'nın yönetiminde hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için yeni perspektifler sunmaktadır. Gelecekte yapılacak daha kapsamlı çalışmalar, NET ve AAT arasındaki etkileşimlerin daha ayrıntılı incelenmesiyle hastalığın etkin bir şekilde kontrol altına alınmasına yönelik stratejilere katkı sağlayabilir.

Bilim Kodu : 1067
Anahtar Kelimeler : Ailesel Akdeniz ateşi, alfa-1 antitripsin, nötrofil ekstrasellüler tuzaklar, akut faz reaktanı
Sayfa Adedi : 141
Danışman : Prof. Dr. Ayşegül ATAĞ YÜCEL

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS
AND THE RELATIONSHIP OF ALPHA 1 ANTITRYPSIN ACUTE PHASE
REACTANT SERUM LEVELS WITH THE DISEASE CLINIC IN CHILDREN WITH
FAMILY MEDITERRANEAN FEVER

(Ph.D. Thesis)

Hatice Kibriya FİDAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

December 2024

ABSTRACT

In this study, the association of neutrophil extracellular trap (NET) formation and Alpha-1 Antitrypsin (AAT) levels with disease clinic in childhood Familial Mediterranean Fever (FMF) was investigated. The aim of the study was to understand the role of NET and AAT levels in different clinical groups of AAA and to shed light on new treatment strategies in the management of the disease. Within the scope of the study, NET formation and AAT levels were analyzed in control group and patient groups with different clinical conditions such as remission, fever, pleurisy, peritonitis and arthritis. These analyses were associated with variables such as age, gender and genetic mutation (specifically M694V mutation). According to the research findings, no significant difference was found between age and gender and AAA disease. White blood cell (WBC) counts were higher in the peritonitis group compared to the other groups, while neutrophil (NEU) percentage (%) and NEU count (103/uL) were similar in all groups. However, it was observed that NET formation increased as NE levels increased. In addition, AAT levels of the pleurisy group were significantly higher than the other groups. A strong statistical association was detected between NET formation and AAT levels. Accordingly, the increase in AAT levels is directly related to NET formation. In the presence of the M694V mutation, NET measurements showed higher averages compared to the control group. Nevertheless, AAT levels did not show a statistical difference according to the presence of mutation. These findings indicate that NET formation and AAT levels interact significantly in AAA and that this interaction may play a critical role in the pathogenesis of the disease. The results of the study offer new perspectives for the development of targeted therapeutic approaches in the management of AAA. More comprehensive studies in future may contribute to strategies for effective control of the disease by further analysis of the interactions between NET and AAT.

Science Code : 1067

Key Words : Familial mediterranean fever, alpha-1 antitrypsin, neutrophil extracellular traps, acute phase reactant

Page Number : 141

Supervisor : Prof. Dr. Ayşegül ATAĞ YÜCEL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başlamam konusunda beni destekleyen, eğitim sürecinde bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan, sabırla tez çalışmamda rehberliğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşegül Atak Yücel'e; bu zorlu ama çok gurur verici doktora eğitimine başlama ve tamamlama konusunda yeni kapılar açan, uzmanlık eğitimimin ardından doktora süresince de daima en büyük desteğim olan sayın hocam Prof. Dr. Hüsnü Oğuz Söylemezoğlu'a; hem doktora eğitimim hem de tez sürecimde destekleri için değerli hocalarım Prof. Dr. Resul Karakuş, Prof. Dr. Emin Ümit Bağrıaçık ve Prof. Dr. Özlem Gülbahar'a; bu süreçte hem akademik hem de manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, tez dönemindeki uzun saatler çalışmalarım sırasında, hazırlık ve laboratuvar süreçlerinde yanımda olan, ne zaman ihtiyaç duysam destek olan arkadaşlarım, Dr. Payam Nematiattar, Göksu Ceylan ve Ülger Fettahlıoğlu'a; bu zorlu doktora sürecine başlama vesile olan, birlikte yürüdüğüm, gece gündüz birlikte sınavlara hazırlandığım, umutsuzluk ve yorgunluk anlarımda hep devam etmemi sağlayan can dostlarım her ihtiyacım olduğunda bir telefon mesafesinde olan, tüm sıcaklığıyla yanımda olan arkadaşlarım Prof. Dr. Yelda Bilginer ve Doç. Dr. Çiğdem Erol'a; tezimdeki zor aşamalardan birinde sağladığı istatistik konusundaki desteği benim için gerçekten çok kıymetli olan Prof. Dr. Bülent Çelik'e; tez çalışma dönemimde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Esra Baskın, Doç. Dr. Handan Kayhan, Öğr. Gör. Dr. Sanem Gökçen, Prof. Dr. Banu Çelikel Acar, Doç. Dr. Elif Çelikel, Dr. Yağmur Bayındır ve Dr. Nazmi Mutlu Karakaş'a; Gazi Üniversitesi Hematoloji ve Metabolizma laboratuvarlarındaki teknisyen arkadaşlarım Suhaner Seçkin, Tolga Yücetaş ve Betül Derin'e; beni sevgiyle büyüten, çalışmayı ve vazgeçmemeyi öğreten, tüm eğitim hayatım boyunca güç veren canım annem ve babama ve aileme ve Nerim Bitlislioğlu'a

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu araştırma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TGA-2022-7873 proje kodu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi	5
2.1.1. Tarihçe ve epidemiyoloji	5
2.1.2. Patogenez.....	7
2.1.3. Klinik bulgular.....	10
2.1.4. Laboratuvar bulguları	13
2.1.5. Genetik.....	14
2.1.6. Tanı	16
2.1.7. Ayırıcı tanı	17
2.1.8. Eşlik eden hastalıklar.....	18
2.1.9. Ailevi Akdeniz Ateşinin hastalık şiddetinin değerlendirilmesi.....	18
2.1.10. Tedavi	20
2.1.11. Prognoz	24
2.2. Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları (NET)	24
2.2.1. NETozis	28
2.2.2. NEU kinetiği.....	34

	Sayfa
2.2.3. NET formasyonu	36
2.2.4. Parazitlerde NETozis	37
2.2.5. Bakteri, mantar ve virüslerde NETozis.....	39
2.2.6. NETozis temelli tedavi seçenekleri	39
2.2.7. NETozis ve ilişkili hastalıklar.....	40
2.2.8. NET’lerin doku hasarındaki rolü	43
2.2.9. NET’lerin otoimmünitede ve sistemik otoenflamasyondaki rolü.....	44
2.2.10. NETozis ölçüm metodları	47
2.3. Alfa-1 Antitripsin	49
2.3.1. Alfa-1 antitripsin proteini	49
2.3.2. Alfa-1 antitripsin geni	55
2.3.3. Alfa-1 antitripsin proteinin yapısı.....	55
2.3.4. Alfa–1 antitripsin ve kardiyovasküler sistem	57
2.3.5. Alfa-1 antitripsin eksikliği	58
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1. Çalışmada Kullanılan, Kit Kimyasal ve Gereçler	61
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Sarflar	61
3.1.2. Çalışmadada Kullanılan Gereçler	62
3.2. Çalışma Gruplarının Demografik ve Klinik Özellikleri.....	62
3.3. Katılımcıların Araştırmaya Dahil Olma ve Dışlanma Kriterleri	63
3.4. Laboratuvar Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması	64
3.5. Alınan Kan Örneklerinden Nötrofil (NEU) İzolasyonu	65
3.5.1. Nötrofil izolasyonunun temel ilkeleri.....	65
3.5.2. Nötrofillerin izolasyonu süreci	65
3.5.3. İzole edilen nötrofillerin canlılık oranlarının belirlenmesi.....	66
3.6. Nötrofillerde NET Formasyonunun Ölçümü	67

	Sayfa
3.6.1. NET formasyonunun ölçümünde temel ilke.....	67
3.6.2. NETozis formasyonu ölçümü sırasında hazırlanan çözeltiler ile bu çözeltilerin hazırlanma biçimleri	68
3.6.3. NET formasyon ölçümü	68
3.7. İstatistiksel Analiz	69
4. BULGULAR	71
5. TARTIŞMA.....	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	101
KAYNAKLAR.....	107
EKLER.....	137
ÖZGEÇMİŞ	139

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Tel-Hashomer AAA tanı kriterleri.....	17
Çizelge 2.2. Yalçinkaya-Özen kriterleri	17
Çizelge 2.3. Pras ve arkları tarafından belirlenen hastalık ağırlık skorlaması	19
Çizelge 2.4. FMF için uluslararası şiddet skorlama sistemi (ISSF)	19
Çizelge 2.5. Çeşitli AAT fenotipleri ile ilişkili serum konsantrasyonları aralığı	54
Çizelge 3.1. Nötrofil izolasyonunda kullanılan kitler	61
Çizelge 3.2. Kullanılan Araç-Gereçler * Hematoloji laboratuvarının desteği ile kullanılmıştır	62
Çizelge 3.3. Çalışmaya dahil edilen hastaların gruplandırılması	63
Çizelge 4.1. Çalışma kapsamındaki çocukların yaş gruplarına göre dağılımı	71
Çizelge 4.2. Çalışma kapsamındaki AAA hastası farklı atak gruplarındaki çocukların yaşa göre dağılımı	72
Çizelge 4.3. Çalışma kapsamındaki çocukların cinsiyet gruplarına göre dağılımı	72
Çizelge 4.4. Çalışma kapsamındaki AAA hastası farklı atak gruplarındaki çocukların cinsiyete göre dağılımı	73
Çizelge 4.5. Çalışma kapsamındaki çocukların tam kan sayımı NEU yüzdelerinin (CBC-yüzde) göre karşılaştırılması	73
Çizelge 4.6. Çalışma kapsamındaki çocukların izole edilen NEU sayılarının ($\text{nx}10^3/\mu\text{L}$) karşılaştırılması	73
Çizelge 4.7. Çalışma gruplarının tam kan sayımındaki WBC* sayılarına ($\text{nx}10^3/\mu\text{L}$) göre karşılaştırılması	74
Çizelge 4.8. Çalışma gruplarının serum AAT* düzeylerine (mg/dL) göre karşılaştırılması	74
Çizelge 4.9. Çalışma gruplarının NETozis ölçüm (mU/ml) değerlerine göre karşılaştırılması	75
Çizelge 4.10. Çalışma kapsamındaki AAA atak ve remisyon çalışma gruplarının CRP (mg/L) değerlerine göre karşılaştırılması.....	76
Çizelge 4.11. Çalışma kapsamındaki farklı AAA atak grupların NETozis ölçüm değerlerinin (mU/ml) karşılaştırılması.....	78

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.12. Çalışma kapsamındaki farklı AAA atak gruplarının serum AAT* düzeylerinin (mg/dL) karşılaştırılması.....	78
Çizelge 4.13. Çalışma kapsamındaki farklı AAA atak gruplarında kan CRP değerlerinin (mg/L) karşılaştırılması.....	79
Çizelge 4.14. Çalışma kapsamındaki ateş içeren farklı AAA atak gruplarının NETozis ölçüm değerlerinin (mU/ml) karşılaştırılması	79
Çizelge 4.15. Çalışma kapsamındaki ateş içeren farklı AAA atak gruplarının serum AAT* düzeylerinin (mg/dL) karşılaştırılması	80
Çizelge 4.16. Çalışma kapsamındaki ateş içeren farklı AAA atak gruplarının kan CRP değerlerinin (mg/L) karşılaştırılması	80
Çizelge 4.17. Plöritli ve Plöritsiz atak gruplarının NETozis, serum AAT düzeyi ve kan CRP değeri ölçümlerine göre karşılaştırılması	81
Çizelge 4.18. Çalışma kapsamındaki farklı AAA atak, remisyon ve kontrol gruplarında değişkenler arasındaki korelasyonlar	81
Çizelge 4.19. Çalışma kapsamındaki AAA atak ve remisyon gruplarının mutasyon durumlarının dağılımı*	82
Çizelge 4.20. AAA hastalarının atak ve remisyon gruplarında mutasyonların heterozigot, homozigot ve compant heterozigot durumlarının dağılımı*	82
Çizelge 4.21. Mutasyon gruplarının NETosis (mU/ml) değerlerine göre karşılaştırılması	83
Çizelge 4.22. Mutasyon gruplarının AAT* (mg/dL) değerlerine göre karşılaştırılması.	83
Çizelge 4.23. Mutasyon gruplarının CRP (mg/L) değerlerine göre karşılaştırılması.....	83
Çizelge 4.24. Farklı atak grupları ve remisyon grubunda heterozigot, homozigot ve compant heterozigot mutasyonların dağılımı	84

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. AAA hastalığının göç haritası.....	6
Şekil 2.2. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalık patogenezi	8
Şekil 2.3. MEFV mutasyonlarının spektrumu	15
Şekil 2.4. Nötrofil granülositler periferel kan yayma (İmmersiyon objektifi (x100)) ...	25
Şekil 2.5. NETozis gelişimi aşamaları	27
Şekil 2.6. İntihara götüren NETozis immünopatogenezi	31
Şekil 2.7. Yaşamsal NETozis immünopatogenezi.....	32
Şekil 2.8. NETozis gelişim mekanizması.....	32
Şekil 2.9. Nötrofillerin NETozis sürecinin düzenlenmesinde rolleri a) Stimüle olmamış insan nötrofili b) Uyarılmış nötrofiller c) Kromatin fibrillerinin hücrenin dışına çıkışı d) Nötrofil tuzağı	34
Şekil 2.10. Otoimmün hastalıklarda netozis basamakları	46
Şekil 2.11. SERPINA1 geni yapısı.....	55
Şekil 2.12. Alfa-1 antitripsin proteinin yapısı	56
Şekil 2.13. Alfa-1 antitripsin tarafından NEU elastazın inhibisyonu.....	56
Şekil 4.1. Nötrofillerin metilen mavisi boyası ile boyanması (İmmersiyon objektifi (x100)).....	74
Şekil 4.2. Serum AAT düzeyi ortalamalarının atak, remisyon ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.3. NETozis ölçüm değeri ortalamalarının atak, remisyon ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.4. Çalışma kapsamındaki AAA atak ve remisyon gruplarının kan CRP değeri ortalamalarının açısından karşılaştırılması	77
Şekil 4.5. Atak grubunda NETozis ölçümü ile kan CRP değeri değişkenleri arasındaki korelasyon.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
AAA	Ailevi Akdeniz Ateşi
AAT	Alfa-1 antitripsin
AATE	Alfa-1 antitripsin eksikliği
AOM	Akut Orta Kulak İltihabı
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CRP	C-Reaktif Protein
ER	Endoplazmik Retikulum
ESH	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
EULAR	Avrupa Romatizma Birliği
HSP	Henoch-Schönlein Purpurası
ISSF	Uluslararası AAA Şiddet Skoru Sistemi
KOM	Kronik Orta Kulak İltihabı
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz 9
MPP	Multipotent Projenitör Hücreler
NE	Nötrofil elastaz
NET	Nötrofil Ekstraselüler (Hücre Dışı) Tuzakları
NEU	Nötrofil
NGAL	Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin
NOX	NADPH Oksidaz (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz)
PAD4	Peptidil Arjinin Deiminaz-4
PAN	Poliarteritis Nodosa
PMA	Forbol miristat asetat (<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>)
PMN	PoliMorfoNükleer lökosit
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
SAA	Serum Amiloid A
TNF	Tümör Nekroze Edici Faktör

1. GİRİŞ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), tekrarlayan ateş, serozit atakları ile karakterize, otozomal resesif geçiş gösteren genetik bir otoenflamatuvar hastalıktır. Kalıtsal periyodik ateş sendromlarından olup diğer klinik fenotipleri arasında en yaygın olanıdır. Pirin proteinini kodlayan MEFV (MEditerranean FeVer) genindeki mutasyon sonucu oluşur. Bu mutasyonlar içerisinde en sık görülen E148Q mutasyonu olup diğer sık gözlenen mutasyonlar ise V726A, M694V, M694I ve M680I olarak saptanmıştır. MEFV gen mutasyonlarının varlığı, hastalığın fenotipinin şiddetini ve tedaviye verilecek yanıtı belirlemede kritik rol oynamaktadır. Pirin proteinindeki mutasyonlar, interlökin-1 gibi enflamatuvar mediatörlerin aşırı üretilmesine ve enflamasyonun şiddetlenmesine yol açmaktadır. Bu hastalık, özellikle Akdeniz kökenli Yahudi, Türk, Ermeni ve Arap topluluklarında yüksek prevalansa sahip olup, bölgesel ve genetik faktörlerin etkileşim göstermesi açısından dikkat çekicidir.

Ailevi Akdeniz Ateşi sıklıkla çocuklarda görülmekte olup ilk başvuruda hastaların % 90'ı 20 yaş altındadır. Klinik özellikleri; 12-72 saat süren, periton, plevra, eklem ve deri tutulumunun olduğu enflamasyon ataklarıdır. Ataklar 1-3 gün sürer; ateş, plöretik göğüs ağrısı, karın ağrısı, artrit ve erizipel benzeri deri döküntüsü görülebilir [1, 2]. Hastalığın tanısı, tipik belirtiler, kolşisin tedavisine verilen yanıt ve genetik test sonuçlarına dayanarak konmaktadır. Kolşisin, atak sıklığını ve şiddetini azaltmada etkili bir tedavi seçeneğidir. AAA'nın en ciddi komplikasyonu amiloidozdur. Böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilir ve erken ölüme neden olabilir. Hastalığın şiddetini değerlendirmek için çeşitli skorlama sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemler hastalığın başlangıç yaşı, atak sıklığı, eklem tutulumu ve amiloidoz varlığı gibi faktörlere dayanmaktadır.

AAA ile ilişkili diğer hastalıklar arasında vaskülitler, juvenil idiyomatik artrit ve enflamatuvar barsak hastalığı bulunmaktadır. Genel olarak AAA yönetimi, hastalığın erken tanınması ve etkin tedavi stratejilerinin uygulanması ile optimize edilmektedir. Otoenflamatuvar hastalıklarda, özellikle AAA olan çocuklara tanı koymak zordur. AAA'nın tipik klinik seyri, ataklar ve remisyonlar şeklindedir. Ataklar sırasında gözlenen akut faz reaktanı (C-reaktif protein,vb) düzeylerinde ve eritrosit sedimentasyon hızında artış, lökositöz bulguları genellikle ataksız dönemlerde normale döner. Bu bağlamda, akut faz testlerinin atak ve ataksız dönemler arasındaki değişimi, AAA tanısı için bir belirteç olarak kullanılmıştır. C-

reaktif protein (CRP) düzeyi ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) en sık kullanılan akut faz testleridir [1, 2]

Alfa-1 Antitripsin (AAT) proteini, SERPINA1 geni tarafından 14. kromozomun uzun kolunda kodlanmaktadır. AAT, serin proteaz inhibitörleri ailesinin bir üyesi olarak, özellikle hepatositlerde ve makrofajlarda farklı promotor kullanımı ile doku türüne özgü ekspresyon gösterir. Genin yapısı, proteinin çeşitli doku ve hücrelerdeki dağılımını etkileyebilir ve AAT'nin vücuttaki enflamatuvar ve immün yanıtları düzenlemedeki rolünü belirginleştirir. AAT, özellikle hepatositler tarafından üretilir ve enflamasyon sırasında plazma konsantrasyonu artar. Akut faz reaktanı olarak çoğu dokuda ve vücut sıvısında bulunan AAT, Nötrofil elastaz (NE) gibi proteolitik enzimleri inhibe eder ve bu sayede proteolizisi düzenler. AAT'nin eksikliği, genellikle S ve Z alellerinin varlığı ile karakterize edilmektedir ve bu durum özellikle Avrupa kökenli bireylerde daha yaygındır.

NETozis ise NEU'lerin patojenlere karşı savaşmak için hücre dışı tuzaklar (NET'ler) oluşturduğu bir süreçtir. Bu tuzaklar, DNA, histonlar ve antimikrobiyal proteinler içermektedir. NETozisin iki türü tanımlanmıştır: Klasik (veya intihar) ve Yaşamsal (vital) NETozis. Klasik NETozis yolu, NEU'lerin hızla ölümüyle sonuçlanırken, vital yol, NEU'lerin canlı kalmasıyla gerçekleşmektedir. NET'lerin aşırı üretimi ve yetersiz parçalanması, enflamasyon durumunda dokulara zarar verebilir ve hastalığın şiddetini artırabilir. Bu süreçte NEU'ler granüllerde bulunan antimikrobiyal proteinlerle birlikte kendi DNA'larını ağ benzeri yapılar oluşturacak şekilde dışarı salarlar. Bu yapılar, mikroorganizmaları fiziksel olarak hapsederek onların yayılmasını engeller ve antimikrobiyal etkiler gösterir. NET'ler, sadece NEU'ler tarafından değil, eozinofiller ve makrofajlar gibi diğer immün hücreler tarafından da üretilir. NET oluşumu, enflamatuvar sitokinlerin ve kemoatraktanların salgılanmasıyla tetiklenmektedir ve bu süreçte histonlar gibi proteinlerin modifikasyonu ve kromatinin dekonsolidasyonu yer almaktadır.

NETozis NEU'ler tarafından özellikle enfeksiyonlara yanıt olarak başlatılan bir savunma mekanizmasıdır. Patojenlerin etkisiz hale getirilmesi ve yayılmasının önlenmesi için NEU'lerin kendi DNA'sını, histonları ve antimikrobiyal proteinleri içeren NET oluşturarak salmasıyla karakterize edilir. NETozis, çeşitli uyarılar tarafından tetiklenebilir, bunlar arasında mikrobiyal komponentler, enflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türleri (ROS)

bulunur. Ancak NET'ler aynı zamanda konak dokulara zarar verebilir ve otoimmün hastalıklar, tromboz ve kronik enflamatuvar durumlarla ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışma da AAA hastalığı olan çocuklarda atak ve remisyonunda NET formasyonu ve AAT düzeylerinin çalışılması ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Bu araştırma, hastalıkla ilişkili enflamasyonun biyolojik mekanizmaları ve yolakların tanımlanması, hastalığın patogenezeine ışık tutulması ve AAA'nın yönetimi ve tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunmayı hedeflemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

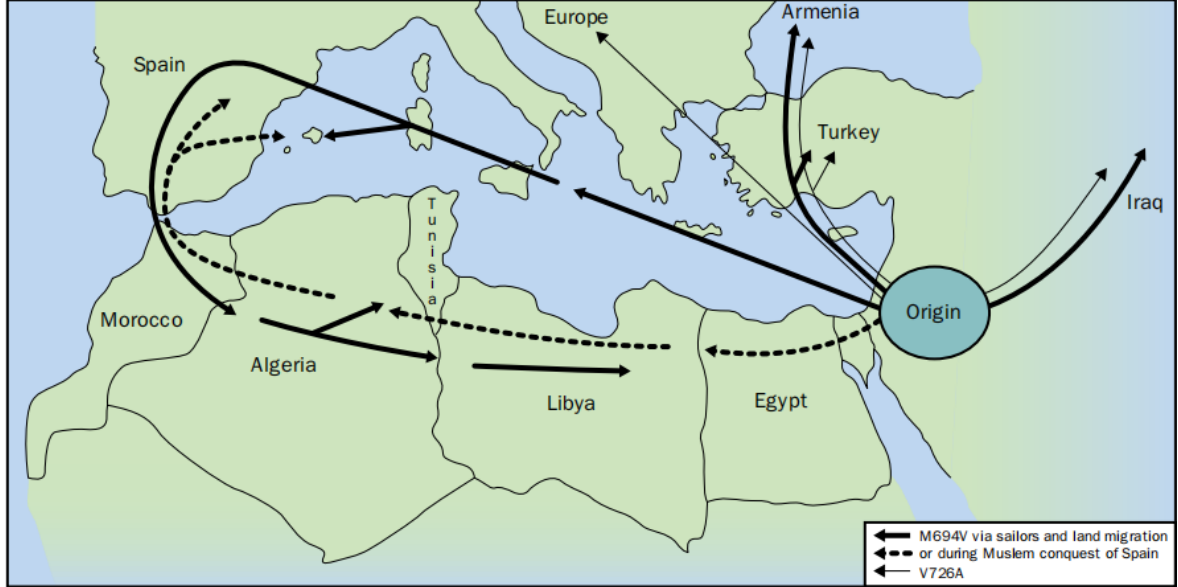
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), ateş ve çeşitli enflamatuvar belirtilerle karakterize edilen, kendiliğinden geçen deri dökülmeleri, peritonit, plevrit, artralji ve artritis gibi eklem rahatsızlıklarını içeren otoenflamatuvar bir hastalıktır. Bu rahatsızlık, otozomal resesif bir geçiş göstermekte olup atakların süresi sabit değildir. Birkaç saat ile birkaç gün arasında değişebilmektedir, bazen yılda bir kez ortaya çıkmaktadır. Ataklar genellikle 12 ila 96 saat arasında sürmektedir. AAA, özellikle Türk, Arap, Yahudi, Ermeni gibi genetik yatkınlığı olan topluluklarda dünya ortalamasının üzerinde bir sıklıkla görülmektedir. 1992 yılında MEFV geni AAA ile ilişkilendirilmiş ve bu gen Uluslararası FMF Konsorsiyumu ile Fransız FMF Konsorsiyumu tarafından klonlanarak 1997 yılında yayımlanmıştır [3, 4, 5, 6].

2.1.1. Tarihçe ve epidemiyoloji

Ailevi Akdeniz Ateşi, ilk defa 1945 yılında Siegal tarafından “benign paroksizmal peritonit” adı altında tanımlanmış, etnik kökenden bağımsız ve alerjik kökenli olduğu düşünülmüştür [7]. 1951’de hastalığın ailevi geçiş özelliği ve amiloidoz ile bağlantısı tespit edilmiştir [8, 9, 10]. “Ailevi Akdeniz Ateşi” ismi ise 1958’de Heller ve ark.ları tarafından önerilmiştir [11]. Hastalık özellikle Akdeniz bölgesiyle ilişkilendirilmekte olup, ilk olarak Yahudi ve Ermeni topluluklarında görülmüş, ardından Arap ve Türk toplulukları arasında da yaygınlaşmıştır (Şekil 2.1). Göçlerin etkisiyle zamanla çeşitli bölgelere de yayılmıştır. Akdeniz bölgesi dışındaki ülkeler olan ABD ve Japonya’da da vakalar bildirilmiştir [3, 4].

AAA, özellikle Akdeniz kökenli etnik gruplarda, en yaygın olarak Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar arasında 1/500 sıklıkla görülmektedir. Türkiye, yaklaşık 1:1000 prevalansı ile en yüksek AAA hastası sayısına sahip ülke olarak dikkat çekmektedir. Türkiye’nin 85 milyonluk nüfusu içinde 100.000’den fazla AAA hastası olduğu tahmin edilmektedir. Aşkenazi olmayan Yahudilerde taşıyıcılık oranı 1:5, Araplarda 1:16, Türklerde 1:5 ve Ermenilerde 1:7 civarındadır [12, 13].



Bu eski mutasyonlar İncil dönemlerinde Orta Doğu'da ortaya çıkmış gibi görünmektedir. M694V mutasyonu, ya Orta Doğu'dan gelen ilk denizciler aracılığıyla ya da daha sonra İspanya'nın Müslümanlar tarafından fethi sırasında kara göçü yoluyla doğuya doğru İspanya ve Kuzey Afrika'ya göç etmiştir. V726A da Orta Doğu'dan Ermenistan, Türkiye ve Avrupa'ya (Aşkenaz Yahudileri) göç etmiştir. Mallorcan Chuetalarındaki FMF, Sefarad Yahudilerinde olduğu gibi ortaya çıkmış olabilir, ancak ek mutasyonlar da meydana gelmiş olabilir.

Şekil 2.1. AAA hastalığının göç haritası [4]

Aievi Akdeniz Ateşi'nin yaygın olduğu bölgelerde en sık rastlanan genetik mutasyonlar arasında M694V, M694I, V726A, M680I ve E148Q bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar, bu mutasyonların Orta Doğu'daki AAA hastalarının %85'inden fazlasında bulunduğunu göstermektedir. Ben-Chetrit ve Touitou tarafından yapılan bir çalışmada, M694V, V726A ve E148Q mutasyonlarının Mezopotamya'da 2500 yıl kadar önce ortaya çıktığı belirtilmiştir. Bu mutasyonlar, Anadolu'dan Mezopotamya'ya (günümüzdeki Türkiye toprakları) yerleşen ilk insanlarda gözlemlenmiştir. Taşıyıcılık oranlarının bu bölgelerde 1/3 ile 1/5 arasında değişmesi, bu genetik yapıların seçici avantaj sağladığını düşündürmektedir [3, 4].

Park ve arkadaşlarının çalışması, mutant pirin proteininin *Yersinia pestis* virülans faktörü olan YopM ile insan pirin proteine göre daha az etkileşimde bulunduğunu ve YopM ile indüklenen interlökin-1 (IL-1) baskılanmasını zayıflattığını ortaya koymuştur. Bu araştırmalara göre, AAA hastalarından ve asemptomatik taşıyıcılardan alınan lökositler, *Y. pestis*'e yanıt olarak yüksek IL-1 salınımı gösterirken, M680I/M680I homozigot mutasyonu taşıyan farelerin, vahşi tip farelere göre IL-1'e bağlı olarak daha fazla hayatta kaldığı görülmüştür. Bu bulgular, Akdeniz popülasyonlarında AAA mutasyonlarının *Y. pestis*'e karşı yüksek direnç sağladığını ortaya koymaktadır [14]. Ben-Chetrit ve Touitou'a [12] göre, M694V mutasyonu 8. yüzyılda Fenikeli gemiciler aracılığıyla Akdeniz'den İspanya ve

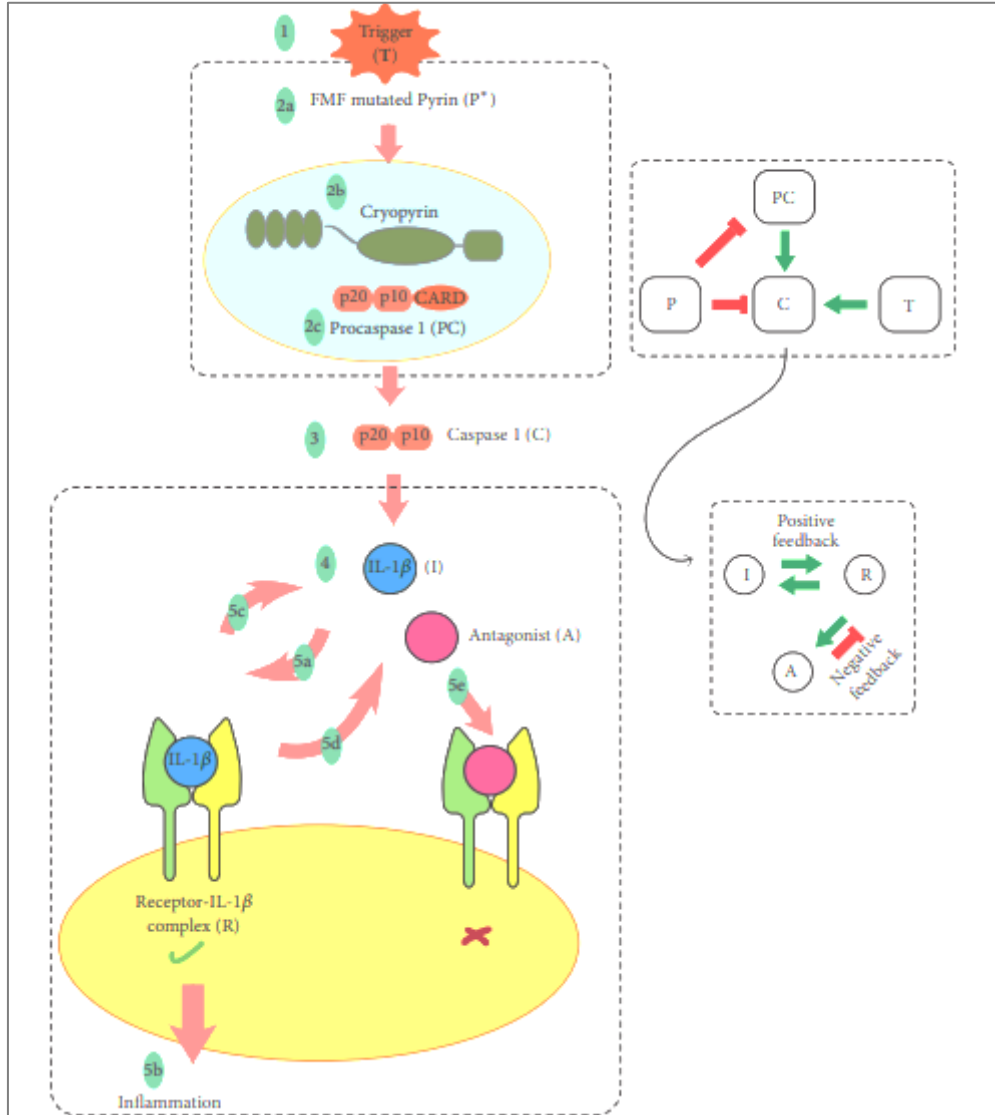
Kuzey Afrika'ya yayılmıştır. V726A mutasyonunun ise deniz yolu ile Avrupa'ya ulaştığı düşünülmektedir. Ermenistan'a Türkiye'den kara yolu ile geçtiği öne sürülmektedir. "Chuetas" isimli topluluk, 11. yüzyılda İspanya'dan Palma de Mallorca'ya sürülen din değiştirmiş Yahudilerin torunlarıdır ve bu toplulukta 60'tan fazla AAA hastası bulunmuş, yaklaşık 18 ailede bu durum teşhis edilmiştir. AAA'nın klinik belirtileri ve haplotip analizi, Kuzey Afrika'daki Yahudilerde AAA ile büyük benzerlik göstermektedir. Bu durum, iki nüfusun kurucularının 8. yüzyılda Orta Doğu'dan gelen Müslümanlarla birlikte İspanya'da yaşamış olabileceğini göstermektedir.

Avrupa'da görülen AAA vakalarının çoğunun Orta Doğu kökenli olduğu ve hastalığın eski zamanlarda Avrupa'ya, modern zamanlarda ise Amerika'ya yayıldığı öne sürülmektedir. Japonya'daki AAA vakalarının, mutasyonların Türkiye'den İpek Yolu bağlantısı aracılığıyla yayılmış olabileceği düşünülmektedir. M694I ve E148Q mutasyonlarının sık görülmesi, sporadik mutasyonlardan ziyade Türkiye kökenli yayılım ihtimalini desteklemektedir. Bu bilgiler, AAA'nın genetik temelleri ve coğrafi yayılımı hakkında önemli veriler sunmaktadır [12, 13].

2.1.2. Patogenez

AAA, otoenflamatuvar bir hastalıktır ve doğal bağışıklık sistemindeki bozukluklara bağlı sistemik enflamasyon atakları ile karakterizedir. Otoenflamasyonda NEU'ler, monositler, makrofajlar ve kompleman sistemi önemli rol oynar. Patern tanıma reseptörleri (PRR), ekzojen patojen ilişkili (PAMP) ve endojen hasar ilişkili moleküler kalıpları (DAMP) tanıyarak, enflamatuvar yanıtı başlatır. Bu süreçte, Nükleer faktör κ B (NF κ B) ve interferon düzenleyici faktörler (IRF) aracılığıyla proenflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonu aktive edilir. Toll-benzeri reseptörler (TLR) gibi membran bağlı PRR'ler, hücre dışında ve hücre içi endozomlarda PAMP'ları tanır ve NF- κ B gibi proenflamatuvar sitokin indükleyici transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu tetikler. Ayrıca, sitozolik bir PRR seti de hücre içindeki patojenleri ve tehlike sinyallerini algılar. Pirin ve diğer reseptörler inflamazom adı verilen multiprotein komplekslerinin oluşumuna neden olur. Bu inflamazomlar kaspaz-1'i aktive ederek, IL-1 β ve IL-18 gibi sitokinlerin salınımını "piroptozis" adı verilen hücre ölümünü başlatarak enflamasyonu yönetir (Şekil 2.2). "Hücrel enflamatuvar nekroz" olarak da bilinen ve ilk kez 20012'de tanımlanmış olan piroptozis, Gasdermin-D'nin (GSDMD) kaspaz-1 tarafından parçalanması sonucu meydana gelir. Gasdermin-D doğal

immün sistem bileşenlerinden bir protein olup hücre membranında porlar oluşturur. Piroptosis ayrıca lipopolisakkaritlerin kaspaz-4 ve 5'e doğrudan bağlanmasıyla tetiklenebilir, kaspaz oligomerizasyonu ve GSDMD'nin bölünmesiyle sonuçlanır. Bu nedenle, piroptoz; enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtında önemlidir [15, 16].



Pyrin mutantlarında (1 ve 2a) tetikleme ile inflamazom oluşum süreci tetiklenir. Kriopyrin proteini ve prokaspaz 1 kompleksi, işlevsiz Pyrin nedeniyle bir inflamazoma dönüşür (2b ve 2c). Prokaspaz 1, inflamazom etkisiyle Kaspaz 1'e dönüşür (3). IL-1 β , Kaspaz 1 tarafından olgunlaştırılır (4). IL-1 β reseptöre bağlanır (5a). IL-1 β 'nin bağlanmasıyla IL-1 β sinyal kaskadı ve ardından inflamasyon aktive olur (5b). Reseptör-IL-1 β kompleksi tarafından verilen sinyal, proIL-1 β 'nin daha fazla transkripsiyonuna yol açarak IL-1 β seviyelerinde artışa neden olur. Burada sadece IL-1 β 'nin Kaspaz 1'den bağımsız olarak işlenmesini dikkate almıştık (5c). Reseptör-IL-1 β kompleksi tarafından verilen sinyal de antagonist üretimini uyarır (5d). Antagonistin reseptöre bağlanması aktif IL-1 β sinyali ile sonuçlanmaz (5e).

Şekil 2.2. Ailevi Akdeniz Ateşi hastalık patogenezi [17]

AAA patogenezi, pirin proteininin bozulmasına yol açan MEFV genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Pirin proteini, tehlike sinyallerini tanıyan PRR (patern tanıma reseptörleri) ailesinin bir üyesi olup; doğal bağışıklık hücrelerinde bulunur ve enflamasyon sürecini düzenleyen inflamazomun oluşumunda kilit rol oynar. PRR'lerin tanıdığı bu sinyaller, PAMP (patojen ilişkili moleküler patern) ve DAMP (tehlike ilişkili moleküler patern) olarak adlandırılır. Pirin'in aktive olmasıyla, kaspaz-1 adı verilen proenflamatuvar bir proteazı toplayan ve aktive eden "inflamazom" adı verilen multiprotein sinyal kompleksleri oluşur. Pirin proteininin üretimi doğal bağışıklık hücrelerinde (NEU'ler, eozinofiller, monositler ve dendritik hücreler) gerçekleşir. Ayrıca, lipopolisakkarit (LPS) ile interferon-gama (IFN- γ), tümör nekroze edici faktör-alfa (TNF- α), interlökin-4 (IL-4) ve interlökin-10 (IL-10) gibi sitokinler bu proteinin ekspresyonunu artırabilir.

Pirin domaini (1-92. aa) (PYD) bölgesi, pirin proteinin N-terminal kısmında yer alır ve enflamasyon süreçlerinde görev alan 20'den fazla proteinin yapısında bulunur. Bu bölge aracılığıyla pirin, inflamazom adaptör proteini olan ASC (apoptoz ile ilişkili spek benzeri protein) ile etkileşim kurar. B-box (370-412) ve α -helikal, coiled-coil (420-440) bölgelerinin ise pirin oligomerizasyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu iki bölgenin ayrıca, hücre iskeleti organizasyonu için kritik bir protein olan prolin serin treonin fosfataz ile etkileşim kurduğu gösterilmiştir. PSTPIP1/CD2BP1 genindeki missense mutasyonları, otozomal dominant olarak kalıtılan ve 'piyojenik artrit, piyoderma gangrenozum ile akne (PAPA)' sendromuna yol açan otoenflamatuvar hastalıkların gelişmesine neden olur. Pirin proteininin C-terminal kısmındaki B30.2 bölgesi de özellikle önemlidir çünkü AAA ile ilişkili mutasyonların büyük bir kısmı bu bölgede yoğunlaşmaktadır. Çeşitli bakteriyel toksinler tarafından Rho guanozin trifosfataz (Rho GTPaz)'ların modifikasyonu ile kaspaz-1 aktivasyonunda rol alan Pyrin, RhoA ile aktive olan serin-treonin kinazlar (PKN1 ve PKN2), pyrini bağlar ve fosforile eder. Fosforillenmiş pirin, düzenleyici 14-3-3 proteinlerine (regulatory 14-3-3 protein) bağlanır ve pirin inflamazomu bloke edilir. AAA mutasyonlarının çoğunun kümелendiği B30.2 bölgesinin C terminalini etkileyen mutasyonlar, PKN1 gibi kinazların bağlanmasını inhibe ederek pirin fosforilasyonunu kontrol etmede önemlidir. Bu da pirin inflamazomu aktivasyonu için gereken eşiği düşürür [16]. Özetle pyrin, Rho GTPaz inaktivasyonunu algılar ve kaspaz-1 aktivasyonu aracılığıyla enflamatuvar yanıtı başlatır. MEFV genindeki mutasyonlar pirin inflamazomu aktivasyonunu arttırarak enflamasyona yatkınlık yaratır (Şekil 2.2).

Pirin inflamazomu oluşumunda önemli yollardan biri ASC'nin pirine bağlanması ve oligomerizasyonunu indüklemesidir. Oto-proteolitik süreç ile aktif kaspaz-1 p10/p20 tetramerine dönüşerek pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in aktifleşmesini sağlar. AAA'da enflamasyona nedenlerinden biri olan, IL-1 β ve IL-18 dahil olmak üzere sitoplazmik içeriğin salınmasına neden olan GSDMD aracılı piroptozistir. Bu sitokinler doğal bağışıklık cevabını olarak ateş, hematopoez, lenfosit aktivasyonu, lökosit toplanması ve antikör sentezi gibi çeşitli savunma süreçlerini başlatırlar [16].

AAA patogenezinde; atakların görüldüğü bölgeye NEU'lerin toplanması nedeniyle NEU'ler önemli yer tutar. Ancak AAA'daki IL-1 β aracılı enflamasyonda NEU'lerin görevi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [18]. Yakın zamanda NET olarak adlandırılan, enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan enflamatuvar durumlarda NEU'lerden salınan bir mekanizma tanımlanmıştır. NET'ler, NEU'lerin granül bileşenleri ve kromatin liflerinden oluşan hücre dışı yapılardır. NET'lerin oluşum mekanizmaları ve rol oynayan moleküller kesin bilinmemekle birlikte, bazı enflamatuvar uyarılar veya otofaji gibi mekanizmalar ile NET'lerin oluşumu açıklanmaktadır [19, 20, 21]. Apostolidou ve ark.larının yaptığı çalışmada, NEU'ler tarafından IL-1 β üretiminin ve NET aracılığıyla salınmasının AAA ataklarını tetiklediğini; salınan NET'lerin ileri NETozis'i azaltarak atakların kendiliğinden gerilediği öne sürülmüştür [22].

2.1.3. Klinik bulgular

AAA kendini sınırlayan, tekrarlayan ateş ve serozit atakları ile karakterize otozomal resesif geçişli, dünyada en sık görülen otoenflamatuvar sendromdur [1, 2, 23]. Atakları genellikle çocukluk çağında başlar, hatta vakaların 2/3'ünde hastalık başlangıç yaşı beş yaşından küçüktür [24, 25]. Özellikle AAA'nın sık görüldüğü toplumlarda hastalık tanısının daha erken yaşlarda olduğu görülmektedir. Bu durum, muhtemelen bu bölgedeki hekimlerin bu hastalığı bilmesi ve daha erken tanı koymasıyla da ilişkilidir. Bu hastalığın klinik belirtileri; ateş, karın ağrısı, eklem bulguları, göğüs ağrısı, erizipel benzeri eritem, skrotal tutulum, kas bulguları, vaskülitik, nörolojik tutulum ve pelvik tutulum olup belirtiler ataklar halinde görülür. Ataklar düzensiz aralıklarla olur ve tipik olarak 12 saat-3 gün arasında devam eder [26].

Ateş

AAA hastalığının en dikkat çekici belirtilerinden biri 38-40°C arasında olan ateştir. Bu ateş genellikle ani aşılangıçlı olup süresi altı saat ile üç gün arasında değişkenlik gösterir. Ateş, bazen tek başına görülebileceği gibi bazen diğer AAA belirtilerine de eşlik edebilir. Özellikle süt çocukluğu döneminde sadece ateş atakları görülebilir. [3, 4, 27, 28, 29, 30].

Karın ağrısı

Karın ağrısı, hastaların %90'ında gözlemlenir ve vakaların yarısında ilk belirti olarak ortaya çıkar. Karın ağrısı herhangi bir öncül belirti olmaksızın aniden başlar. Vakaların %30'unda karın ağrısı ile birlikte ishal de görülür; ishal özellikle çocuklarda daha sıktır [3, 4]. Karın ağrısı, bazen belirli bölgeler lokalize olup akut apandisit veya akut kolesistit ağrısına benzer, bazen de karın geneline yayılabilir [31]. Fizik muayenede karın bölgesinde hassasiyet ve distansiyon gözlemlenebilir. Peristaltik seslerde azalma mevcuttur ve radyolojik olarak bağırsaklarda küçük hava seviyeleri saptanabilir. Karın kaslarının tahta gibi sert olması da dikkat çekici bir bulgudur. Karın ağrılarının şiddeti ve süresi değişkenlik gösterir; ağrı genellikle 12-24 saat içinde azalmaya başlar. Atakların tamamen sona ermesi 2-3 gün sürebilmektedir. Bazı durumlarda karın ağrısı yerine karında şişkinlik ve rahatsızlık gibi belirtiler de ortaya çıkabilir. AAA'nın karın ağrısı belirtileri, klinik olarak akut batına benzediği için gereksiz apandektomi veya laparotomiye yol açabilmektedir [32, 33, 34].

Eklem bulguları

AAA'deki eklem belirtileri %60-70 oranında, ateş ve karın ağrısı olmaksızın da görülebilir. Rapor edilen vakaların %70'inde artrit, %30'unda ise artralji tespit edilmektedir. Bu hastalıkla ilişkili artrit, vakaları çoğunlukla alt ekstremitelerin bir ya da iki büyük eklemine etki eden, kalıcı hasar bırakmayan ve gezici olmayan, akut monoartrit biçiminde ortaya çıkar. İyileşme süreci birkaç gün ile bir-iki hafta arasında değişebilir [35]. M694V mutasyonu olan bireylerde eklem ataklarının sıklığı ve şiddeti daha fazla olup, bu hastalarda amiloidoz riski de daha yüksektir [36]. Sinoviyal sıvının bakteriyolojik incelemesi yapılırsa negatif sonuç alınır [34, 37]. Ayak bileği artriti vakalarının yaklaşık %50'sinde eritem de görülür. Bazı kronik artrit vakaları kalıcı hasar bırakabilmektedir [35, 38, 39].

Göğüs ağrısı

Bu ağrılarının ani başlangıçlı olması ve hızla iyileşmesi, enfeksiyöz plöritten ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır. Hastaların radyografilerinde plevral sıvı tespit edilebilir, bu durumda sıvı birikimi nedeniyle akciğer sesleri azalabilir [3, 4, 30]. Ağrı, genellikle göğsün tek tarafında hissedilmekte ve tipik plöreziye bağlı göğüs ağrısı biçiminde gelişebilmektedir [3, 4]. Göğüs ağrısı, Türklerde ve Ermenilerde, Aşkenazi olmayan (Sefarad) Yahudilere kıyasla daha sık görülmektedir. M694V homozigotluğu ile plörit arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur [30].

Erizipel benzeri eritem

AAA en dikkat çekici belirtilerden biri erizipel benzeri eritemdir. Bu bulgu, genellikle uzun seyahatler veya yürüyüşler sonrasında ortaya çıkar ve çoğunlukla bacakların ekstansör yüzeyinde, ayak bileği ya da ayak dorsumunda tek taraflı olarak görülür. Daha nadir görülen belirtiler arasında nodüler eritem veya nonspesifik makülopapüler döküntüler bulunmaktadır [30, 34].

Skrotal tutulum

AAA hastalarının yaklaşık %5'inde, genellikle yirmi yaşından önce, tek taraflı skrotal tutulum gözlenebilir. Bu durum kızarıklık, şişlik ve hassasiyet şeklinde kendini göstermektedir. Bulgular 12-24 saat içinde azalmaya başlar. Skrotal ataklar, abdominal ataklarla birlikte görülebilir [30, 40].

Kas bulguları

Kas ağrıları, özellikle M694V mutasyonuna sahip AAA hastalarında oldukça yaygındır. Ağrılar genellikle ağır fiziksel egzersizler ya da uzun süre ayakta kaldıktan sonra kendini gösterir. En sık rastlanan kas ile ilgili belirti, baldır kaslarında görülen egzersize bağlı bacak ağrısıdır. Bu kas ağrıları, bilateral olarak alt ekstremitelerde febril miyalji şeklinde de görülebilir [41, 42]. Ataklar, uzun yolculuklar ve pasif titreşimlerle tetiklenebilir; miyalji, eğer dikkatli şekilde incelenmezse, kalıcı enflamasyona yol açarak hastalığın şiddetini artırabilir [43, 44]. Kaslarla ilgili en şiddetli belirtilerden olan uzamış ateşli miyalji, yoğun kas ağrısı ve 10 haftaya kadar süren ateş ile karakterize olup belirgin bir akut faz

yanıtı oluşturmaktadır. Uzamış febril miyaljide eritrosit sedimentasyon hızı normalin yaklaşık 100 katı olup, istirahat ve kortikosteroidlerle normale indirilebilir [41, 45]. Bu durum, düzenli kolşisin kullanımına rağmen ortaya çıkabilmektedir [46].

Vaskülit

AAA tanısı almış bireylerin IgA vaskuliti/Henoch-Schönlein Purpurası (IgAV/HSP) ve Poliarteritis Nodosa (PAN) gibi diğer vaskülitik hastalıklara yakalanma olasılığı daha yüksektir [38].

Nörolojik tutulum

AAA hastalarında baş ağrısı en yaygın belirtilerden bir tanesidir [39, 47]. AAA'lı hastaların %23,5'inde baş ağrısı en yaygın belirti olarak öne çıkar, ardından miyalji ve baş dönmesi gelir. Nörolojik belirtiler özellikle E148Q gibi belirli genetik mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir, bu mutasyon M694V gibi diğer mutasyonlara kıyasla daha yüksek bir insidanda bulunmuştur. Bu genetik bağlantı, AAA hastalarında nörolojik sonuçları etkileyebilecek olası bir genotip-fenotip etkileşimine işaret etmektedir. Ayrıca juvenil idiyopatik artrit varlığı da nörolojik belirtiler için riski artırır, bu durum sistemik enflamatuvar süreçler ve nörolojik hassasiyet arasındaki etkileşime işaret etmektedir [48].

Pelvik tutulum

AAA tanısı konmuş kadınlarda enflamasyon kaynaklı pelvik yapışıklıkların ve abdominal atakların fertilité üzerinde olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir [30, 49, 50]. AAA ataklarında belirtiler 1-2 saat içinde zirveye ulaşır, 12-24 saat boyunca sabit kalır, sonraki 6-12 saat içinde yavaşça azalmaya başlar. Belirtiler 24-72 saat içinde tamamen geriler. AAA'da hastalığın tipik klinik seyrinden veya hastanın alışılmış ataklarından farklı görünen belirtiler dikkatle izlenmeli ve olası acil durumlar olarak değerlendirilmelidir [51].

2.1.4. Laboratuvar bulguları

AAA'de hastalığın kesin tanısını koyduracak spesifik bir laboratuvar testi mevcut değildir. Ataklar esnasında lökositozun yanısıra C-reaktif protein (CRP), serum Amiloid A (SAA), fibrinojen, beta-2 mikroglobulin, C3 ve C4 düzeylerinde ve eritrosit sedimentasyon hızında

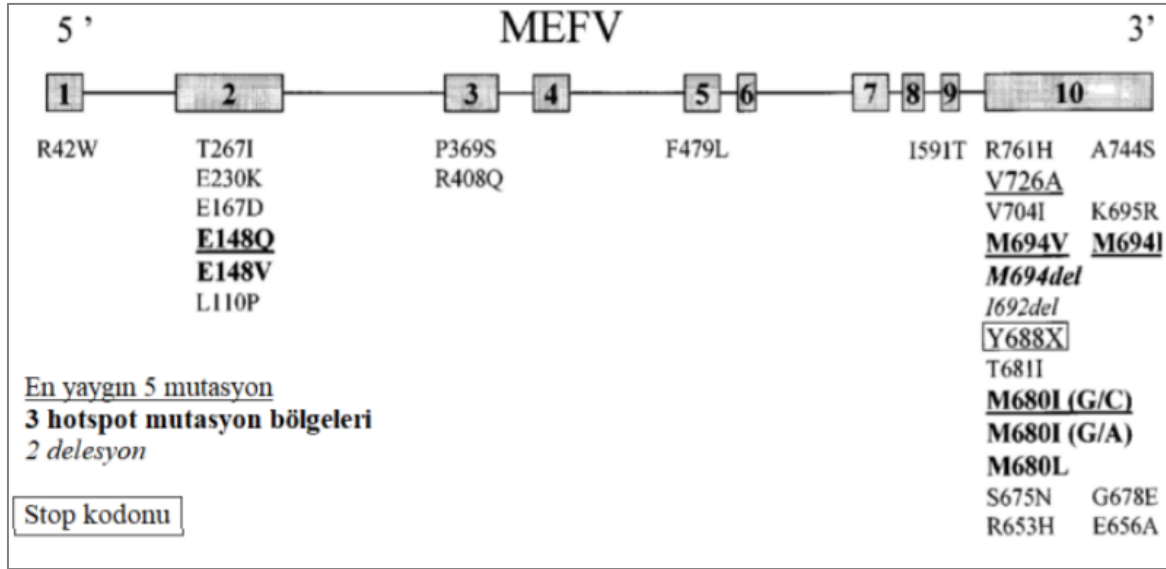
(ESH) artış gözlemlenmektedir [52]. Ayrıca enflamasyon dönemlerinde IL-1, tümör nekroze edici faktör (TNF) ve interferon seviyelerinde artış olmaktadır [53]. Özellikle AAA atakları sırasında SAA seviyelerinde belirgin bir artış yaşanmakta, ataklar arasındaki dönemlerde ise bu seviyeler genelde normale dönmektedir. Ancak AAA hastalarının yaklaşık %30'unda SAA da dahil olmak üzere enflamatuvar belirteçler normal seviyelere geri dönmez ve subklinik enflamasyon devam eder. Bu durum, amiloidoz gelişim riski ile bağlantılıdır [54]. AAA'nın en ciddi komplikasyonlarından biri olan amiloidoz açısından proteinüri tespiti büyük öneme sahiptir ve düzenli olarak idrar analizleri yapılması gerekmektedir [55].

2.1.5. Genetik

MEFV geni, 16p13.3 kromozomal bölgesinde konumlanmış 10 ekzon ve 15 kilobaz boyutunda bir gen olarak tanımlanmaktadır. Bu gen tarafından kodlanan protein, 781 aminoasit uzunluğundadır [33]. MEFV geni üzerinde yapılan araştırmalarda yaklaşık 393 farklı varyant veya mutasyon saptanmış ve bu bulgular "Infevers" veri tabanında kayıt altına alınmıştır [56].

2012 yılında, kalıtsal periodik ateş sendromlarının genetik sonuçlarının değerlendirilmesiyle ilgili bir rehber oluşturulmuş ve bu sendromlarda görülen genetik varyantlar kesin patojenik olanlar, önemi bilinmeyen varyantlar ve rapor edilmesine gerek olmayan normal varyantlar olmak üzere üçe ayrılmıştır [57]. Genin mutasyonlarından %59'u özellikle ekzon 10 ve ekzon 2 içinde bulunmaktadır [58]. AAA hastalığında sık rastlanan mutasyonlar arasında M694V, M680I, M694I ve V726A mutasyonları bulunmaktadır, bunlar ekzon 10'da yer almaktadır. Bu dört mutasyon, tespit edilen mutasyonların yaklaşık %74'ünü oluşturmaktadır [59].

MEFV geni incelenirken (Şekil 2.3), genellikle ekzon 2'deki E148Q, T267I, E167D mutasyonlarına; ekzon 3'teki P369S; ekzon 5'teki F479L; ekzon 9'daki I591T ve ekzon 10'daki M680I, M694V, V726A, M694I, A744S, I692del, R761H, K695R mutasyonlarına öncelik verilmektedir [57]. E148Q, F479L, P369S, K695R ve I591T gibi varyantlar, klinik olarak önemleri henüz net olarak belirlenememiş sınıflandırmalara dahil edilmektedir [60, 61].



Şekil 2.3. MEFV mutasyonlarının spektrumu [59]

MEFV varyantlarının etnik gruplara göre dağılımı incelendiğinde Türk ve Ermeni popülasyonlarında M694V mutasyonu oldukça yaygın olarak görülmektedir [24]. Arap kökenli bireylerde V726A en sık rastlanan varyant olurken ardından M680I gelmektedir; Kuzey Afrika Yahudilerinde M694V ve E148Q, Irak Yahudilerinde V726A ve M694V, Japon vakalarında ise E148Q, M694I ve L110P mutasyonları en yaygın olanlardır [12]. Türkiye'deki Ulusal Genetik Konsorsiyumu tarafından yapılan ve 27.504 hastayı kapsayan bir araştırmada M694V %29,47, E148Q %18,27, R202Q %17,90, M680I %10,61 ve V726A %10,14 sıklıkla belirlenmiştir [62].

MEFV genindeki tek bir mutasyonu bulunan ya da hiç mutasyon saptanmayan hastalar, vakaların yaklaşık %25-30'unu oluşturmaktadır [63]. AAA, otozomal resesif bir hastalıktır. Ancak klinik olarak AAA özellikleri gösteren hastaların neredeyse dörtte birinde ikinci allele mutasyon gösterilememektedir. Bu hastaların tanısı klinik olarak konulmakta ve tedavi verilmektedir [12]. Bu durumun açıklaması, digenik kalıtım, diğer modifiye edici genlerin etkisi, epigenetik faktörler veya çevresel faktörlerle olabilir [3, 4]. Bununla birlikte İspanyol kökenli bir ailede şiddetli AAA kliniği ve amiloidoz gelişimiyle ilişkilendirilen ekzon 5'te bulunan MEFV mutasyonu H478Y'nin otozomal dominant şekilde aktarıldığı tespit edilmiştir [64, 65]. Ekzon 10'da yer alan M680I ve M694V varyantları şiddetli fenotipli hastalıklara neden olmaktadır. M694V homozigot mutasyonu ağır klinik belirtiler, sık ataklar, yoğun artrit ve amiloidoz komplikasyon riski ile ilişkilendirilmektedir [66, 67, 68].

M694I mutasyonunun, M694V kadar yaygın olmamakla birlikte benzer şekilde böbrek tutulumu ve erizipel benzeri eritem ile ilişkili olduğu saptanmıştır [69, 70]. Yalçınkaya ve ark.larının gerçekleştirdiği çalışmada, V726A mutasyonunun ciddi fenotipler ve amiloidoz ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir [71]. Yunan toplumunda yapılan araştırmalar, V726A homozigot ve V726A/E148Q bileşik heterozigot mutasyonlarına sahip bireylerde perikardit ve amiloidoz bulgularının eşlik ettiğini ortaya koymuştur [72].

E148Q varyantının önemi bilinmeyen bir mutasyon olduğu, hastalık yaratmadığı ve iyi huylu bir polimorfizm olduğu iddia edilmiştir [73]. Ancak Türk toplumunda yapılan çalışmalar, E148Q mutasyonunun tekrarlayan karın ağrısı, artrit, göğüs ağrısı ve perikardit gibi yaygın fenotipik bulgularla ilişkili olduğunu göstermiştir [74]. V726A ve E148Q mutasyonlarının bir arada bulunduğu kompleks alel durumlarında amiloidoz riskinin arttığı belirtilmiştir [75].

Bernot ve ark.ları. [76] tarafından R202Q mutasyonunun benign bir polimorfizm olduğu ve hastalık oluşturmadığı tanımlanmıştır. Giaglis ve ark.larının [77] yaptığı çalışma, sağlıklı toplumda %0,7 oranında bulunan R202Q homozigot mutasyonunun hastalıkla ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

2.1.6. Tanı

AAA hastalığının tanısı, tipik klinik göstergeler, diğer olası nedenlerin eleme süreci, kolşisin tedavisine verilen pozitif yanıt ve genetik testlerin sonuçlarının bir araya getirilmesiyle konulmaktadır [78]. Laboratuvar ve radyografi bulguları tanının desteklenmesinde ve ayırıcı tanı süreçlerinde yarar sağlamaktadır. Tanı koymak için kullanılan birkaç kriter bulunmakla birlikte “*Tel-Hashomer kriterleri*” AAA’nın teşhisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu kriterlerin duyarlılık oranı erişkinlerde %95, özgüllük oranı ise %97’nin üzerindedir. Tel Hashomer kriterlerine göre ‘iki majör’ veya ‘bir majör ve iki minör’ bulguya sahip hastalar “kesin AAA” olarak, ‘bir majör ve bir minör’ bulguya sahip hastalar ise “olası AAA” olarak değerlendirilmektedir [79].

Çizelge 2.1. Tel-Hashomer AAA tanı kriterleri

Majör kriterler	Minör kriterler
- Artrit ve/veya seröz zar iltihaplanmaları içeren tekrar eden ateşli hastalık atakları. - Başka bir hastalığa bağlı olmayan AA tipi amiloidoz durumu. - Kolşisin tedavisinden olumlu yanıt alınması.	- Tekrar eden ateşli dönemler - Erizipel tarzı döküntüler - Birinci derece akrabalarda AAA öyküsü bulunması

Tel-Hashomer kriterlerinin çocuk AAA hastalarındaki özgüllüğü %54,6'dır. Yapılan bir çalışmada çocukların ağrının yerini ve şiddetini belirtmede zorlandıkları, göğüs ağrılarının genellikle tek taraflı olmadığı, bazı hastalarda atakların 12 saatten kısa sürdüğü ve hastaların %20'sinde ateş olmadığı saptanmıştır. Ayrıca çalışma Türk çocuklarda yapıldığı için Tel-Hashomer destekleyici kriterlerinden olan apendektomi ve anne-baba arasında akrabalık hikayesi, Türk toplumunda yaygın olması nedeniyle kontrol grubunda da kriterleri karşılamamanın fazla olduğu ve bu yüzden özgüllüğün azaldığı görülmüştür. Bu nedende çocuk AAA hastalarına yönelik “Yalçinkaya-Özen kriterleri” tanımlanmıştır. Çocukluk çağında AAA'nın teşhisi için özelleştirilmiş yeni pediatrik kriterler oluşturulmuştur. ‘İki veya daha fazla’ kriterin olması ile AAA tanısı konur [80].

Çizelge 2.2. Yalçinkaya-Özen kriterleri [80]

Kriterler	Tanım
Ateş	≥3 kez,6-72 saat süren aksiller >38°C ölçülen ateş atağı
Karın ağrısı	≥3 kez,6-72 saat süren atak
Göğüs ağrısı	≥3 kez,6-72 saat süren atak
Artrit	≥3 kez,6-72 saat süren atak, oligoartrit
AAA için aile hikayesi	

2.1.7. Ayırıcı tanı

AAA hastalığı, klinik ve laboratuvar bulgularının başka hastalıklarla benzerlik göstermesine rağmen deneyimli bir klinisyen için atakların tanınmasıyla tanı kolayca konabilmektedir. AAA'nın ayırıcı tanısı, özellikle periyodik ateş sendromları göz önünde bulundurularak yapılmaktadır. Periyodik ateş sendromları, tekrar eden ateş ve enflamatuvar ataklarla karakterize olan, otoantikörlerin ve antijene spesifik T hücrelerinin bulunmadığı otoenflamatuvar hastalıklar grubunu ifade etmektedir [81, 82]. AAA'nın klinik tanısı konulmadan önce karın ağrısı yaratan diğer potansiyel sebepler de ele alınmalıdır. Bunlar arasında cerrahi aciller, vaskülitler, sistemik lupus eritematozus, abdominal migren, akut

intermittan porfiria, epilepsi, tekrarlayan pankreatit ve hipertrigliseridemi gibi durumlar yer almaktadır [83].

2.1.8. Eşlik eden hastalıklar

AAA, bir enflamatuvar hastalık olup bu duruma vaskülitlerin ve diğer enflamatuvar rahatsızlıkların eşlik edebildiği bilinmektedir. En sık rastlanan vaskülitler arasında IgA vaskuliti/Henoch Schönlein purpurası (IgAV/HSP) ve Poliarteritis nodosa (PAN) yer almaktadır. IgAV/HSP, AAA hastalarının yaklaşık %7'sinde, PAN ise %1'inde görülmektedir. Behçet hastalığının eşlik etme oranı ise daha azdır. Türk AAA çalışma grubunun elde ettiği verilere göre IgAV/HSP'nin sıklığı %2,7, PAN'ın sıklığı ise %0,9 olarak tespit edilmiştir [84]. Ayrıca juvenil idiyopatik artrit, enflamatuvar barsak hastalığı, akut romatizmal ateş gibi enflamatuvar hastalıkların da AAA ile görüldüğüne dair araştırmalar mevcuttur [85].

2.1.9. Ailevi Akdeniz Ateşinin hastalık şiddetinin değerlendirilmesi

AAA hastalığının prognozu, atakların sıklığı ve komplikasyonların ortaya çıkışına bağlı olarak değişmektedir. Hastalık erken teşhis ve tedavi edildiğinde, genellikle iyi prognoza sahiptir [86]. Amiloidoz, AAA hastalarında morbidite ve mortalitenin başlıca sebeplerindendir. Amiloidoz teşhisinden sonra hastaların ortalama beş yıl içinde son dönem böbrek hastalığına ilerlediği ve beş yıllık sağkalım oranının %50 olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden, risk faktörlerine sahip olan hastaların daha dikkatli takip edilmesi gerekmektedir [87]. M694V homozigotluğu, kolşisin direnci, tanının geç konulması ve uzun süreli hastalık süreci gibi faktörler yüksek komplikasyon riskiyle ilişkilendirilmektedir [88]. Kolşisin tedavisi başlamadan önce, AAA hastalarının çoğu kırk yaşından önce amiloidoza bağlı böbrek yetmezliği geliştirmektedir. Kolşisin kullanımı başladıktan sonra amiloidozun görülme sıklığı önemli ölçüde azalmıştır ancak tanıdaki gecikmeler ve tedaviye uyumsuzluk nedeniyle özellikle Türk ve Ermeni hastalarda bu komplikasyon hala önemli bir sorun olmaya devam etmektedir [89].

Hastalığın şiddetini belirlemek için kullanılan bazı değerlendirme skorları mevcuttur. Bu skarlardan en sık başvurulana "Pras skoru"dur. Hastalığın başlangıç yaşı, eklem tutulumu, atak sıklığı, erizipel benzeri döküntüler, kolşisin dozu ve amiloidoz varlığı gibi faktörlere

dayanarak puanlama yapılmaktadır. 2 ile 5 puan arası hafif, 6 ile 10 puan arası orta, 10 puan ve üzeri ise ağır hastalık olarak sınıflandırılmaktadır [90].

Çizelge 2.3. Pras ve arkları tarafından belirlenen hastalık ağırlık skoruması

Ağırlık derecesi	Başlangıç yaşı (yıl)	Aylık atak sayısı	Artrit	Erizepel benzeri eritem	Amiloidoz	Kolşisin dozu (mg/G)
0	>31					
1	21 – 31	<1				1
2	11 – 20	1 – 2	Akut	+		1,5
3	6 – 10	>2	Kronik		+	2
4	<6					>2

AAA'nın şiddetini ölçmek amacıyla kullanılan başka bir değerlendirme yöntemi de “*Uluslararası AAA Şiddet Skoruması Sistemi*” (ISSF) olarak bilinir. ISSF hem araştırma hem de klinik pratikte kolaylıkla uygulanabilir ve geniş çapta kabul görmüş bir puanlama sistemidir [91].

Çizelge 2.4. FMF için uluslararası şiddet skoruması sistemi (ISSF)

Kronik sonuçlar; AAA'nın neden olduğu sürekli komplikasyonlar arasında amiloidoz, büyüme yavaşlaması, anemi ve dalak büyümesi yer almaktadır.	1 puan
Organ işlev bozukluğu; FMF ile ilişkili olarak, yüksek düzeyde protein kaybına yol açan nefrotik sendrom gözlenmektedir.	1 puan
Organ yetmezliği; FMF bağlantılı olarak kalp ve böbrek gibi organlarda görülen işlevsel yetersizlikler.	1 puan
Atak sıklığı (Aylık 1-2 Kez); Hastalık atağı, her ay düzenli olarak bir ya da iki kez meydana gelmektedir.	1 puan
Atak sıklığı (Aylık 2'den Fazla); Hastalığın atakları, ayda iki defadan daha sık olarak ortaya çıkmaktadır.	2 puan
Ataksız dönemde artmış akut faz reaktanları; Ataklar arası dönemde, en az iki hafta süreyle CRP, SAA, ESR veya fibrinojen gibi akut faz reaktanlarının yükselmiş olduğu gözlemlenmektedir.	1 puan
Kişiyi özel ataklarda birden fazla organın etkilenmesi; Akut atak sırasında, perikardit, plörit, peritonit, sinovit, erizipel benzeri eritem, testis etkilenmesi ve miyalji gibi birden fazla semptomun görülmesi.	1 puan
Hastalığın seyrinde farklı atak tipleri; İzole ateş, perikardit, plörit, peritonit, sinovit, erizipel benzeri eritem, testis tutulumu, miyalji gibi farklı atak tipleri hastalığın seyrinde birden fazla kez meydana gelmektedir.	1 puan
Atağın süresi; Bir yıl içinde, 72 saatten uzun süren en az üç atak yaşanması.	1 puan
Egzersizle tetiklenen bacak ağrısı; Uzun süreli ayakta durma ya da egzersiz sonrasında meydana gelen ve diğer nedenlerin dışlanması ile ilişkilendirilen bacak ağrısı.	1 puan

AAA olan hastalarının takibinde ve prognozu belirlemede “*Otoenflamatuvar Hastalık Aktivite İndeksi (AutoInflammatory Disease Activity Index [AIDAI])*” and “*FMF50 (Familial Mediterranean Fever 50) skoru*” kullanılabilir. AIDAI ve FMF50 skoru hastalık aktivitesi ve prognozu belirlemede standart bir dil oluşturulması için de gereklidir. AIDAI’de; ateş, tüm semptomlar, karın ağrısı, bulantı/kusma, ishal, baş ağrısı, göğüs ağrısı, ağrılı lenf nodları, artralji veya miyalji, eklemlerde şişlik, göz bulguları, cilt döküntüsü ve ağrının geçmesi parametreleri vardır. Ateş için varsa 1, yoksa 0 puan verilir; diğer 11 parametrede 0=yok, 1=minor, 2=hafif, 3=ağır şiddette bulgu için verilen puanlardır. Skorun

değeri, bir günde 0-34; 31 günlük bir ayda ise 0-1054 arasında değişir. AIDAI'nin validasyonu sonucunda ≥ 9 olan skorun aktif hastaları inaktif hastalardan ayırmada %89 duyarlılık ve %92 özgüllüğe sahip olduğu görülmüştür (42). FMF50, AAA hastalarında hastalık sonucunu gösteren bir skordur (43). FMF50'de tedavi ile atak sıklığı ve süresinde, hastanın/ebeveynin hastalık ağırlığı değerlendirmesinde, artrit atakları sayısında, ESH, CRP veya SAA düzeylerindeki azalma yüzdesi değerlendirilir. FMF50 cevabı, bu altı parametrenin en az beşinde 3-6 ayda en azından %50 düzelme olması ve hiçbir kriterde kötüleşme olmamasıdır.

2.1.10. Tedavi

AAA tedavisinin temel amaçları, atakların sıklığını, süresini ve şiddetini azaltmak hastanın yaşam kalitesini yükseltmek ve sürekli enflamasyonu kontrol altına alarak amiloidoz gelişimini önlenmektir. Hastalardaki atakların şiddeti, türü ve ciddiyeti kişiden kişiye değişiklik gösterdiğinden tedavi her hastaya özgü olarak düzenlenmelidir. Tedavinin izlenmesinde enflamatuvar belirteçler ve proteinüri düzeylerinin takip edilmesi gerekmektedir. AAA'nın yönetimi, akut atakların kontrolü, AA amiloidozun önlenmesi, eşlik eden sağlık sorunlarının ve olası komplikasyonların tedavisi olmak üzere dört ana kategoride toplanabilmektedir [31].

Kolşisin tedavisi

Kolşisin, 1972'den beri AAA tedavisinde yaygın olarak kullanılan, güvenli ve tolere edilebilen bir ilaçtır [92]. Ancak AAA'daki etki mekanizması henüz tamamen anlaşılmamıştır. Kolşisinin, hücre yapısında önemli rol oynayan mikrotübüllerin uzamasını inhibe ederek etki gösterdiği bilinmektedir [93] Mikrotübüller, hücre hareketini sağlayan ipliksi yapılardır ve hücre bölünmesi, sitokin sekresyonu gibi önemli işlevleri vardır. Ayrıca mikrotübüller, enflamatuvar bir süreç olan NLRP3 inflammasomunun aktivasyonu için de gereklidir; bu süreç, pro-IL-1 β 'nin aktif IL-1 β 'ye dönüştürülmesinde rol oynar.

Kolşisin, ayrıca RhoA adlı bir proteinin aktivatörü olarak bilinir. Mikrotübüllerin depolimerizasyonu sırasında GEF-H1 adlı bir faktörün serbest kalmasıyla bu aktivasyon sağlanır. RhoA'nın bu aktivasyonu, pirin proteininin fosforilasyonuna ve dolayısıyla enflamatuvar yanıtın baskılanmasına yol açar. Lipopolisakkarit ile uyarılmış makrofajlarda

yapılan deneyler, kolşisinin RhoA'yı aktive ettiğini ve RhoA inhibitörlerinin etkilerini tersine çevirdiğini göstermiştir [14]. Ayrıca kolşisin, fare makrofajlarında bakteriyel toksinler tarafından tetiklenen kaspaz-1 aktivasyonu, IL-1 β salınımı ve piroptosis gibi enflamatuvar süreçleri zayıflatmaktadır. Bu etkiler, kolşisinin AAA ve enflamatuvar hastalıklar üzerindeki potansiyel rolünü vurgulamaktadır [16].

Kolşisinin emilimi jejunum ve ileumda gerçekleşir; biyoyararlanımı, hepatik, biliyer ve luminal bağırsakta yer alan çoklu ilaç taşıyıcısı P-glikoprotein 1 ile ilişkilidir [94]. İlacın eliminasyonu, esas olarak safra ve dışkı yoluyla olur [95]. Biyoyararlanım oranı %24 ile %88 arasında değişirken yarılanma ömrü 20-40 saat arasındadır. Karaciğer ve böbrek yetmezliği olan hastalarda bu süreler uzar ve böbrek yetmezliği olan hastalarda özellikle GFR'si 25 ml/dk'nın altında olanlarda kolşisinin yarılanma süresi uzayarak toksisiteye yol açabilir [96].

Kolşisinin terapötik indeksi dar bir aralıktadır ve klinik etkilerini gösterdiği serum konsantrasyonları genellikle 7 ng/mL altındadır. Serum konsantrasyonu 10 ng/mL'yi aştığında çoklu organ yetmezliği ve ölüm gibi ciddi toksisite belirtileri ortaya çıkabilir [97]. Yüksek doz ilaç alındıktan yaklaşık 10-24 saat sonra şiddetli gastrointestinal semptomlar görülür, 24 saat ile 7 gün arasında ise çoklu organ fonksiyon bozuklukları, böbrek yetmezliği, kemik iliği yetmezliği, akut respiratuvar distres sendromu, dissemine intravasküler koagülasyon, nöromusküler bozukluklar ve alopesi gibi durumlar gelişebilir [98]. Hastalar hayatta kalırsa iyileşme süreci genellikle bir hafta içinde gerçekleşir [99]. Kallinich ve ark.larının yürüttüğü bir çalışmada kolşisinin uzun süreli kullanımıyla hastaların yaklaşık 2/3'ü tam remisyona girmiş, 1/3'ünde kısmi remisyon görülmüş ve çok az bir kısmında tedaviye yanıt alınamamıştır [100].

AAA tanısı klinik olarak konur konmaz kolşisine başlanması önerilmektedir. Çocuklarda kolşisin kullanımında başlangıç dozu; <5 yaş için $\leq 0,5$ mg/gün, 5-10 yaş için 0,5-1mg/gün, >10 yaş için 1-1,5mg/gün önerilmektedir. Kolşisinin günlük maksimum dozu 12 yaşın altındaki çocuklar için 2 mg, yetişkinler için ise 3 mg olarak belirlenmiştir [31, 101]. Dozaj, klinik belirtilere ve enflamasyonun seviyesine göre ayarlanmalı, maksimum tolere edilebilir doza kadar 0,25 mg/gün şeklinde kademeli olarak artırılmalıdır. Günlük doz tek seferde alınabileceği gibi gün içerisinde bölünerek de verilebilir. Kolşisin, hamilelik ve emzirme dönemlerinde güvenle kullanılabilir, önerilen dozlarda teratojenik veya mutajenik bir risk

taşımadığı bilinmektedir [102]. Ayrıca kolşisin kullanımının düşük, ölü doğum, düşük doğum ağırlığı veya erken doğum ile yüksek oranda ilişkili olmadığı belirtilmektedir. Kolşisin tedavisine başlanan hastalar, ilacın atak sıklığı ve şiddeti üzerindeki etkisini değerlendirmek için 3-6 ay aralıklarla dikkatle izlenmelidir [103].

Kolşisinin amiloidozun önlenmesinde ve ilerlemesinin durdurulmasında etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle amiloidoz gelişmiş AAA hastalarında mümkün olan en yüksek dozda kolşisin tedavisine devam edilmesi gerekmektedir [104]. Son dönem böbrek yetmezliği yaşayan ve renal nakil yapılmış hastalarda da kolşisin kullanımının sürdürülmesi önerilmektedir. Amiloidoz nedeniyle renal nakil yapılmış hastalar ile amiloidozdan bağımsız renal nakil yapılmış hastaların uzun dönem sonuçları karşılaştırıldığında önemli bir fark bulunmamıştır [105, 106]. Bilinen yan etkileri arasında diyare, transaminaz seviyelerinde yükselme, lökopeni ve nöromüsküler toksisite bulunan kolşisin P glikoprotein, tübülün ve CYP3A4 proteinleri ile yoğun etkileşim gösterdiği için bu proteinlerin substratları olan siklosporin, klaritromisin, lipid düşürücü ilaçlar ve greyfurt ile kullanıldığında toksik etkiler meydana gelebilmektedir [31].

Kolşisin direnci

Optimal tedaviye rağmen hastaların yaklaşık %5'i kolşisinin en yüksek tolere edilebilen dozlarına hiçbir şekilde yanıt vermemektedir. Hastaların %20-40'ı ise tam olarak kontrol altına alınamayan ateş ataklarında bir azalma göstererek kısmi bir yanıt sergilemektedir. 2016 yılında Avrupa Romatizma Birliği (EULAR), dirençli durumları en az altı ay boyunca maksimum tolere edilen dozu alan ve her ay bir veya daha fazla atak yaşayan uyumlu hastalar olarak tanımlamıştır [101]. Daha yakın bir tarihte uzman bir grup bu önerileri güncelleyerek uyum, doz ayarlama kriterleri ve yaşam kalitesine yönelik ek öneriler içeren Delphi konsensüs yaklaşımı ile, kolşisine dirençli FMF'yi tanımlayan kanıta dayalı temel ifadeler kullanılmıştır. Bu ifadeler, klinisyenlere ve sağlık otoritelerine FMF hastalarının yönetiminde rehberlik etmek amacıyla oluşturulmuştur [107].

Yakın zamanlarda yapılan çok merkezli ve uzun süreli bir gözlem çalışması, kolşisin kullanımı hakkındaki bu açıklamaların gerçek dünyadaki etkilerini doğrulama fırsatı sağlamıştır. Bu çalışma kapsamında 221 İtalyan AAA hastası ortalama 3,7 yıl süresince izlenmiş; ilaç uyumu genelde yüksek olup hastaların %55,2'si tam yanıt göstermiştir.

EULAR tavsiyelerine göre hastaların %7,7'si dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Bunun yanı sıra hastaların neredeyse %30'u ayda bir ataktan daha az sıklıkta yıllık ateşli ataklarda azalma ile kısmi yanıt verenler arasında yer almaktadır. Kısmi yanıt verenlerin yaklaşık %70'i yılda birkaç atak yaşarken, yaklaşık %30'u daha sık ataklar yaşamıştır. Dirençli veya kısmi cevap gösteren hastalardan hiçbiri önerilen maksimum kolşisin dozuna ulaşamamıştır [108].

Anti IL-1 ilaçlar

Kolşisine direnç gösteren veya kolşisini tolere edemeyen hastalarda biyolojik tedavilere başvurulmaktadır. Bu grup hastalar için önerilen ikinci basamak tedavi IL-1 inhibisyonudur. IL-1 inhibitörleri, atak sayısını önemli ölçüde azaltarak hastaların yaşam kalitesini yükseltmektedir [109]. AAA tedavisinde kullanılan üç farklı IL-1 reseptör antagonisti bulunmaktadır. Anakinra, glikolize edilmemiş rekombinant bir insan IL-1 reseptör antagonistidir. Rilonacept, tip 1 IL-1 reseptörü ve IL-1 reseptör aksesuar proteininin ekstrasellüler bileşenlerini içeren bir füzyon proteindir. Kanakinumab ise IL-1 beta'ya özgü bir etki sunan ve IgG1 sınıfından bir insan monoklonal antikorudur [110].

Son yıllarda kolşisine dirençli AAA hastalarında serozit ataklarının önlenmesinde Anakinra'nın etkili bir role sahip olduğu gözlemlenmiştir. Anakinra, Eurofever kayıtlarına göre kolşisine dirençli hastalarda yüksek etkinlik sağlayan ilaçlardan biri olarak rapor edilmiştir [111]. Anti-IL1 tedavilerinin etkinliği üzerine ilk randomize kontrollü çalışma 2017 yılında yapılmış ve bu çalışma Anakinra'nın kolşisine dirençli AAA hastalarında plaseboya göre etkinliğini ve güvenliğini doğrulamıştır [112]. Çalışma sonuçlarına göre Anakinra grubunda hasta başına ortalama ayda 1,7 atak, plasebo grubunda ise 3,5±1,9 atak görülmüştür. Ayrıca amiloidozlu hastalarda yapılan çeşitli vaka çalışmaları, Anakinra tedavisinin böbrek fonksiyonlarında iyileşme sağladığını bildirmiştir [113, 114].

Kanakinumab, kolşisine dirençli AAA'nın tedavisi için Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA tarafından onaylanmış tek sitokin blokeridir [115]. AAA'da amiloidozla ilişkili proteinüride kayda değer bir düşüş, Kanakinumab tedavisiyle gözlenmiştir [116]. TRAPS ve mevalonat kinaz eksikliği olan hastaları da içeren kolşisine dirençli AAA hastaları üzerinde yapılan çalışmalar, plaseboya karşı Kanakinumab'ın tedavi etkinliğini ortaya koymuştur. Kanakinumab tedavisi altında hastaların %71'inde tam yanıt elde edilmiştir. Tam yanıt elde

edilmeyen hastaların yıllık ateşli gün sayısında azalma meydana gelmiştir. Uzatılmış doz rejimi olarak değerlendirilen uygulamada ise kolşisine dirençli AAA hastalarının yaklaşık yarısında alevlenmeler görülmemiştir [117].

Alternatif tedaviler

IL-6, AAA hastalarının serumunda ataklar sırasında yükselir. Bu yüzden akut faz ile remisyon farkını belirlemek için bir biyobelirteç ve ilaç hedefi olarak incelenmiştir [118]. Tosilizumab, bir IL-6 reseptör blokörüdür; Yılmaz ve ark.ları tarafından, AAA'ya bağlı amiloidoz gelişen 11 hastanın tedavisinde kullanılmış, bu 11 hastanın 10'unda tedavi süresince atak görülmemiş, 8 hastada ise proteinüride azalma tespit edilmiştir. Ancak hiçbir hastada amiloidozun azaldığı biyopsi ile kanıtlanamamıştır [68]. Literatürde allojenik kemik iliği nakli sonrası AAA belirtilerinde gerileme rapor edilmiştir. Milledge ve ark.ları tarafından sunulan bir vakada, doğuştan diseritropoietik anemi ve AAA tanısı olan bir hastada kardeşten yapılan allojenik kemik iliği naklinden 2 yıl sonra kolşisin kullanımına ihtiyaç kalmadığı bildirilmiştir [119].

2.1.11. Prognoz

AAA hastalarında prognoz, genellikle atakların sıklığına, hastalığın gidişatına ve olası komplikasyonlara bağlı olarak değişmektedir. Kolşisin tedavisine uyum sağlayan ve direnç göstermeyen AAA hastaları için prognoz oldukça iyidir. Özellikle M694V homozigot taşıyıcıları ve kas-iskelet sistemi yoğun etkilenmiş olanlar, sık ataklar geçirenler ve tanı konulmasında gecikme yaşananlarda komplikasyon riski yüksektir. AAA hastalarında morbidite ve mortalitenin en önemli sebebi amiloidozdur [120]. Diğer yandan AAA hastalarında sıklıkla görülen ancak genellikle göz ardı edilen uyku kalitesi bozukluğu, depresyon, yorgunluk ve anksiyete gibi semptomlar yaşam kalitesini düşürmekte ve özellikle çalışma çağındaki bireylerde iş gücü kaybına sebep olabilmektedir [121].

2.2. Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları (NET)

Temel olarak kemik iliğinde üretilen NEU'ler, insanlarda yaklaşık olarak 12-14 µm çapında olup kemirgenlerde bu çap ortalama 10,5 µm'dir [122, 123]. İnsanlarda periferik kandaki en yaygın lökosit tipi olarak %50-70 oranında bulunan NEU'ler, kemirgenlerde %20-25

oranında görülmektedir. Her iki türde de üç farklı granül çeşidi içeren NEU'ler, parçalı çekirdek yapılarıyla diğer bağışıklık hücrelerinden ayrılır; bu yapısal özellikler insan ve kemirgen NEU'leri arasında benzerlik göstermektedir [124].

NEU'ler, vücutta enflamatuvar bir süreç başladığında olay yerine ilk ulaşan bağışıklık hücreleridir [125]. İnsanlarda NEU'lerin dolaşımdaki yaşam süreleri, aktive olduklarında 5 saat ile 5 gün arasında değişebilirken [126, 127, 128], farelerde bu sürenin 8 ile 18 saat arasında olduğu belirtilmektedir [129, 130]. Vücutta dört farklı “havuz” içinde bulunurlar; (i) “Mitotik havuz”, kemik iliğindeki miyeloblast, promiyelosit ve miyelosit aşamalarını içerir; (ii) “post-mitotik havuz”, yine kemik iliğinde bulunan metamiyelosit, bant hücre ve olgun NEU'leri kapsar. (iii); kan dolaşımındaki NEU'ler “serbest dolaşan NEU havuzu”; (iv) kemik iliği, karaciğer, dalak gibi dokularda bulunan NEU'ler ise “marjinal NEU havuzu” içinde bulunmaktadır [131].

NEU'ler, doğal bağışıklık sisteminde kritik bir role sahip granülositlerdir. Yabancı genetik materyal algılandığında makrofajlar ve diğer savunma hücreleri, NEU'lerin hedef bölgeye çekilmesini sağlayacak enflamatuvar sitokinler ve kemoatraktanlar salgılamaktadır. Bu süreç, selektin ve integrin aracılığıyla gerçekleşen ekstrasvazasyon ile NEU'lerin enfekte dokulara girişini sağlamaktadır. NEU'ler ayrıca antijen sunan hücrelerin aktivasyonuna ve programlanmasına yardımcı olacak kemotaktik sinyaller üretmektedir. Bunun yanı sıra NEU'lerin salgıladığı TNF, dendritik hücrelerin ve makrofajların farklılaşması ve aktivasyonu üzerinde etkili olmaktadır [20, 132].



Şekil 2.4. Nötrofil granülositler periferel kan yayma (İmmersiyon objektifi (x100))

Nötrofiller, enfeksiyon alanına ilk ulaşan ve savunma hattını oluşturan polimorfonükleer hücrelerdir. Doğal bağışıklık sisteminin temel unsurları olan NEU'ler, sitokin salınımı, fagositoz ve degranülasyon işlevlerinin yanı sıra mikroorganizmalara karşı savunmada NET formasyonu ile de görev almaktadırlar Şekil 2.5 NETler, NEU kromatinlerinin hücre içi

granüller ve proteinler ile birleşerek oluşturduğu ağ benzeri yapıdır. Bu fibriler yapılar, yaklaşık 17 nm çapında pürüzsüz filamentlerden meydana gelmektedirler [19, 133]. Ekstrasellüler tuzaklar sadece NEU'ler tarafından değil aynı zamanda eozinofiller, makrofajlar, bazofiller, mast hücreleri ve monositler tarafından da üretilmektedir [134, 135, 136, 137, 138].

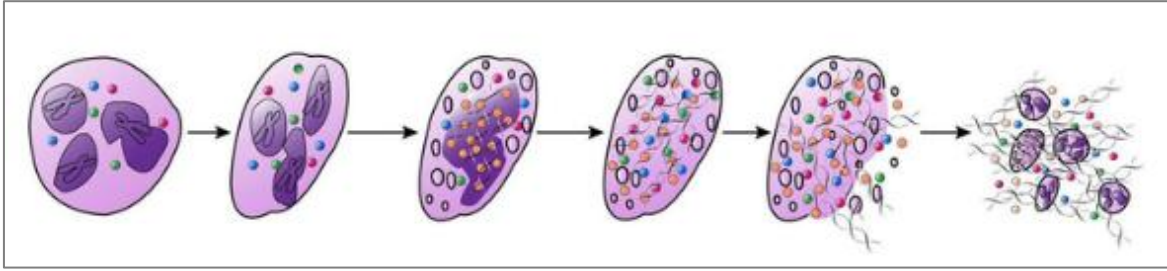
İçerdikleri granüller nedeni ile granülositler arasında yer alırlar. NEU'lerin antimikrobiyal işlevleri, granülleri ile yakından ilişkilidir. Şimdiye kadar dört çeşit NEU granülü saptanmıştır: (i) Azürofil granüller, NEU elastaz, miyeloperoksidaz, katepsin G, lizozim ve defensinler gibi maddeleri barındırmaktadır. (ii) Spesifik granüller, başlıca antiseptik özellikli laktoferrin ve lizozimi içermektedir. (iii) Jelatinaz granüller, çeşitli antimikrobiyaller ve metaloproteazlar gibi jelatinazları depolamaktadır. (iv) Salgı granülleri, NEU yüzeyindeki sitokinler ve çeşitli önemli fagositik reseptörleri taşımaktadır. Bu granüller, fagozomların içinde bulunabileceği gibi NEU'lerin NETozis adı verilen üçüncü antimikrobiyal stratejisi çerçevesinde dışarı salınmaktadır [20, 139, 140].

NETler, NEU'lerin fagositoz ve degranülasyon sonrası enfeksiyon alanında gösterdikleri son savunma mekanizmasıdır. NETler, NEU'ler mikroorganizmalar tarafından uyarıldıktan sonra hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler neticesinde oluşmaktadır [141]. İlk olarak 2004 yılında Brinkman ve ark.ları tarafından tanımlanan bu yapılar, nükleer kromatin ve histonlar, çok sayıda granüler antimikrobiyal protein ve bazı sitoplazmik proteinlerden meydana gelmektedirler [142].

Nötrofillerin aktivasyonu ile çekirdekte meydana gelen yapısal değişiklikler sonucunda kromatin dekonpanse olur ve sitoplazmadaki granül proteinleri ile birleşir. Bu süreçte kromatin ağının sitoplazmik zarı yırtarak hücre dışına çıkması sonucu fibril benzeri bir yapı olan "NET" oluşmaktadır ve bu sürece "NETozis" adı verilmektedir. Kromatinin başlıca proteini olan histonların granül içeriğindeki antimikrobiyal moleküllerden daha güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu düşünüldüğünde, NETozisin fagosite edilemeyen ya da büyük patojenlerin eliminasyonunda önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Apoptozis, nekrozis ve NETozis arasındaki fark, NEU'lerde çekirdeğin dekonfansasyonu ve nükleer zarın yırtılarak granül ve çekirdek bileşenlerinin NETleri oluşturacak şekilde dışa salınmasıdır [143, 141, 144, 145].

NET oluşumu dört aşamalı bir süreç olarak gelişmektedir (Şekil 2.5). Bu süreç [146];

- Reaktif oksijen türevlerinin oluşumu,
- Nötrofilik elastaz ve MPO'nun granüllerden çekirdeğe taşınması,
- Histonların modifikasyonu,
- Hücre zarının yırtılarak kromatinin hücre dışına salınması şeklindedir.



Şekil 2.5. NETozis gelişimi aşamaları

NETozis oluşum mekanizmaları, çeşitli sinyal yolları ve morfolojik uyarıcıların etkisi altında farklılık göstermektedir. Son dönemlerde yapılan araştırmalarda çeşitli hücre tipleri tarafından izlenen farklı yollar ve mekanizmalar ortaya konmuştur. En detaylı bilgiler, Forbol-12-miristat-13-asetat ile tetiklenen NETozis üzerine elde edilmiştir. Bu süreçte polimorfonükleer lökositlerin yüzey reseptörlerinin uyarılmasıyla başlayan reaksiyon, PMA'nın etkisiyle NEU'lerde solunum patlamasını tetiklemekte, protein kinaz C (PKC) ve NADPH oksidaz aktivasyonu ile reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretimine yol açmaktadır. MPO, azürofilik granüllerde bulunan bir enzim olup hidrojen peroksidi (H_2O_2) güçlü mikrobisidal etkiye sahip hipokloröz asite dönüştürmektedir. ROS üretimi sonrası NEU elastazını çekirdeğe taşınmaktadır ve histon-1 ile diğer histonların parçalanarak kromatin decondansasyonunu başlatmaktadır. NET oluşum sürecinde histonlar arginin kalıntılarının sitrüline dönüştüğü "sitrülinasyon" olarak bilinen bir süreçten geçmektedir. Bu süreç, ökromatin ve heterokromatin arasındaki ayrımı ortadan kaldırmakta ve nükleoplazmayı homojen bir yapıya dönüştürmektedir. Histonların sitrülinasyonu, peptid arjinin deiminaz 4 (PAD-4) tarafından katalize edilmektedir ve bu enzimin eksik olduğu durumlarda NETlerin hücre dışına salınım kabiliyeti kaybolmaktadır. Nükleer membranın parçalanması ve decondanse olan kromatinin hücre içi granüllerle karışarak hücre dışına ince filaman demetleri şeklinde çıkmasıyla NETozis tamamlanmaktadır [145, 147, 146, 148, 149, 150, 151, 152].

NETler, bakteri yayılımını önlemekte, virölans faktörlerini azaltmakta ve bu organizmaları ağısı yapılar içinde hapsederek etkisiz hale getirmektedir. NET yapısında yer alan H2A, H2B, H3 ve H4 gibi çekirdek histonları, DNA ile nükleozom çekirdeği oluşturmaktadır ve Histon H1 bu çekirdekleri birbirine bağlayarak kromatinlerin kondensasyonunu sağlamaktadır. NET yapısında bulunan histonlar, uzun süredir bilinen antimikrobiyal etkileri ile dikkat çekmektedir. NETozis süreci sırasında hem histonların hem de DNA'dan ayrılarak mikrobisidal etki gösteren DNA'nın bakterilerle karşılaşması sağlanmaktadır. Ancak NEU'ler, mikroorganizmaların büyüklüğünü algılayarak NET formasyonuna seçici olarak gitmektedir. Branzk ve ark.larının çalışmasında NEU'lerin yalnızca büyük patojenler karşısında NET oluşturduğu, küçük maya veya tek bir bakteriye karşı NETozis gelişmediği belirlenmiştir. Bu seçici mekanizma, dectin-1 aracılığıyla gerçekleşen fagositozun NEU elastazın çekirdeğe taşınmasını azaltması ve mikrobik boyut için bir sensör görevi görmesi ile işlemektedir [133, 153, 154].

Dizanteri etkeni, *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonu ve Leptospirosis gibi çeşitli patojenlerle ilişkili enflamasyon durumlarında NET formasyonunun önemli bir rol oynadığı çok sayıda deneysel ve spontan vaka çalışmasında rapor edilmiştir [19, 155, 156]. NET formasyonunun güçlü antimikrobiyal etkisinin yanı sıra çeşitli hastalıklarla ilişkisi de tespit edilmiştir. Örneğin pulmoner emboli ve derin ven trombozu gibi venöz tromboemboli vakalarında NET formasyonu, trombüsün stabilitesine katkıda bulunan önemli bir iskele işlevi görmektedir [157]. Ayrıca sistemik lupus eritematosus, skleroderma ve romatoid artrit gibi hastalıklarda NETozis süreci sırasında gerçekleşen histon sitrülasyonu, yeni otoantikor epitoplarının oluşumunu teşvik ederek otoreaktif B hücrelerinin aktivasyonuna neden olmaktadır [158]. Akut akciğer hasarı ve akut solunum sıkıntısı sendromu hastalarında ise NET formasyonundaki artış, hastalığın şiddetiyle doğru orantılı olarak artmaktadır [159]. NEU'ler ve onların bileşenlerinin biyofilm formasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir [141, 160]. Biyofilmler, çeşitli yüzeylerde kolonize olarak ve bir polimerik matriks ile çevrili olarak multisellüler topluluklar şeklinde yaşayan bakterilerdir.

2.2.1. NETozis

NETozis terimi, NEU hücre dışı tuzakları ifade eden "NET" ve "-osis" son eki birleştirilerek oluşturulmuştur [161]. Bu terim ilk kez Brinkmann ve ark.ları tarafından 2004 yılında kullanılmıştır. NETozis sürecini başlatan etkenler arasında patojenler, lipopolisakkarit, TNF-

α , IL-8, nitrik oksit, otoantikorlar ve immün kompleksler yer almaktadır [19, 162, 163]. Hücre dışı tuzakların üretimi ilk olarak Takei ve ark.ları tarafından 1996 yılında tanımlanmış olup başlangıçta yalnızca NEU'ler ile ilişkilendirilirken sonraki çalışmalarda eozinofil, bazofil ve mast hücreleri gibi diğer hücrelerin de bu tuzakları üretebildiği belirlenmiştir [162, 164, 165]. Hücre dışı tuzaklar, patojenin tutulması ve etkisiz hale getirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır [166]. Bir NEU, fagosite edemeyeceği bir partikül veya patojenle karşılaştığında hücre dışı tuzakları oluşturmaktadır [167, 168]. Genel olarak NET, enfeksiyonun vücutta yayılmasını engellemekte, patojenin hareketini kısıtlamakta ve profesyonel fagositer hücreler ile antimikrobiyal proteinlerin katkısıyla patojenin yok edilmesini kolaylaştırmaktadır [166].

Hücre dışı tuzaklar, DNA iplikçiklerine bağlanmış histonlar ve çeşitli sitoplazmik antimikrobiyal granüler içeriklerden oluşmaktadır. Bu granüler efektör moleküller arasında MPO, NE, katepsinler, laktoferrin, pentraksin, peptidoglikan tanıma proteini (PRP), kalprotektin ve diğer lökosit peptitleri yer almaktadır. Hücre dışı tuzakları oluşturan DNA iplikçikleri yaklaşık 25-50 nm çapında olup DNaz tarafından parçalanabilir ve bu yapıların temelini kromatin oluşturmaktadır [166]. Hayvanlar, bitkiler ve tek hücreli ökaryotik organizmalar, bağışıklık fonksiyonlarında kromatini kullanmaktadır [169].

NETozis sürecinde NEU çekirdeği loblarını kaybeder, granüller görünürlükten kaybolarak membranda veziküller oluşmaktadır [170]. Çekirdeğin parçalanmasını takiben kromatin uzamakta ve granüler ile hücresel komponentler birleşmektedir. Sitoplazmik membranın parçalanması ile tuzaklar hücre dışına salınmaktadır. NETozis'in şekillenmesine katkıda bulunan çeşitli sinyal yolları vardır ancak bunlar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. İki ana yolak, NADPH bağımlı ve NADPH bağımlı olmayan bilinmektedir [171]. NEU hücrelerde bulunan zarla ilişkili NADPH oksidaz hem enflamasyonun çözülmesi hem de istilacı patojenlerin elimine edilmesinde etkili olmaktadır [172]. Ayrıca NET'lerin otoimmün hastalıkları ve ciddi lokal enflamatuvar süreçleri tetikleyebildiği bilinmektedir. Bu nedenle NETozisi olumsuz yönde düzenleyen mekanizmalar büyük önem taşımaktadır. Serpin B1 proteini, bir serin proteaz inhibitörü olup, NETozisin başlangıç aşamalarında sitoplazmadan çekirdeğe taşınmakta ve kromatin kondensasyonunu engellemektedir [173]. Fizyolojik koşullarda CO_2/HCO_3 konsantrasyonları, pH ve O_2 içeriği oranı NETozis sürecini modüle etmektedir [174].

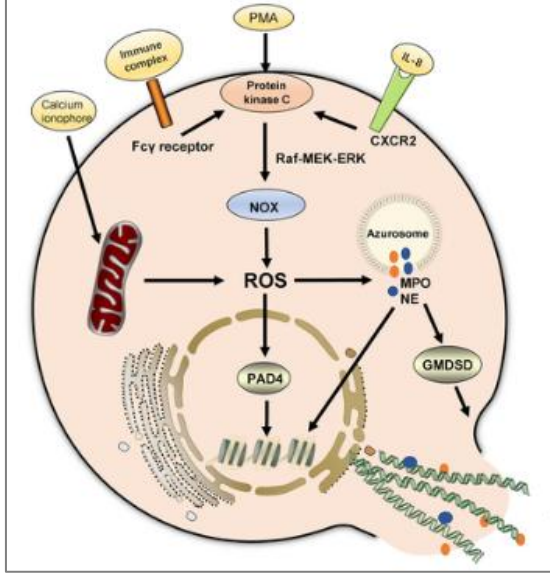
Antikorlar, kolesterol, bakteriler, PMA ve konkanavalin A gibi etkenler NADPH bağımlı NETozis'i tetiklemektedir. Uyarılan NEU'ler reaktif oksijen türleri (ROS) üretmektedir. ROS, MPO gibi granüler enzimleri modüle ederek, NE'nin granülden çekirdeğe taşınmasını sağlamaktadır. NEU çekirdeğinde NE, histonların proteolizini gerçekleştirerek kromatinin yoğunlaşmasına neden olmaktadır. Bu, DNA'nın çekirdekten çıkışı ile hücre dışı tuzakların şekillenmesine yol açmaktadır. Ayrıca kalsiyum akışı ve mitokondriyal ROS üretimi yoluyla kolaylaştırılan ve NO_x'dan (nitrik oksit) bağımsız bir hücre dışı tuzak oluşum süreci de tanımlanmıştır ve bu süreç "mitokondri bağımlı NETozis" olarak adlandırılmaktadır [171].

NADPH bağımlı olmayan NETozis sürecinde hücre dışı tuzakların oluşumu tam olarak çözümlenmemiştir. Bu süreçte NADPH oksidaz ve MPO aktiviteleri gerekli değildir. Histone H3, NE bulunmadığında genellikle sitriline dönüşmektedir. Histonlar, kromatin yapısı içinde DNA'nın paketlenmesinde rol alan, kısa ve basit protein yapılarıdır ve antimikrobiyal özellikler göstermektedirler. Hücre dışı tuzaklarda bol miktarda bulunan histonlar, patojenlere karşı etkili olmakla birlikte konak dokusunda da hasara yol açabilmektedir. Histonların sitrülasyonu, peptidil arjinin deiminazlar (PADs) tarafından arjininin sitriline dönüştürülmesi işlemidir [148, 175].

NETozis ile karşılaştırıldığında konak dokularda meydana gelen diğer hücre ölüm formları olan kanonik apoptoz (mitokondiyel hücre ölüm yolağı), nekroptoz (nekroz veya enflamatuvar hücre ölümü için programlanmış bir hücre ölüm yolağı) ve nekroz; NEU'lerdeki nükleer delobulizasyon ve genişlemenin yalnızca NETozise özgü olduğunu göstermektedir. Apoptoz ve nekroptoz, sırasıyla kaspaz inhibitörleri ve nekrostatin veya MLKL inhibitörleri tarafından engellenmektedir. NETozis, kaspaz yolaklarından bağımsız olarak gerçekleşmekte olup otofaji veya nekrozdaki ayrılan özgün bir hücre ölüm şekli olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca apoptozdan farklı olarak DNA parçalanması göstermeyen NETozis, hücre zarı ve çekirdek membranının yıkımını takiben hücre dışı tuzakların salınımla ilişkilendirilmektedir [171].

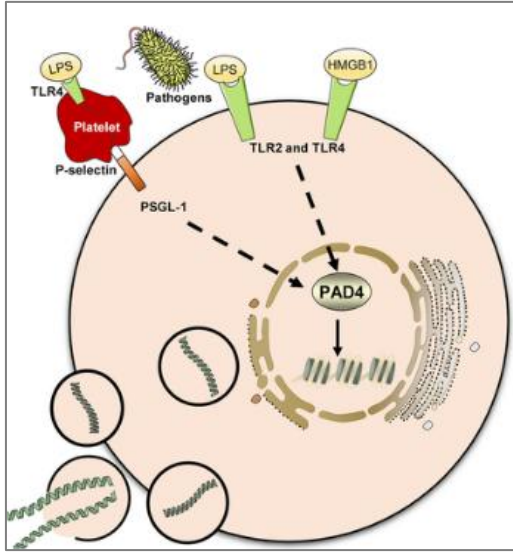
NETozis, temel olarak "litik, klasik veya intihara götüren (*suicidal*)" ve "litik olmayan veya yaşamsal (*vital*)" olmak üzere iki ana yolla gerçekleşmektedir [176]. Patojenler tarafından doğrudan tetiklenen NEU'ler, nükleer ve granüler yapılarının bozulması ve plazma zarının yırtılmasıyla bu yapıları hücre dışına atmaktadır [147]. Bu süreç yaklaşık olarak 2-3 saatte

tamamlanmakta olup “intihara götüren NETozis (Şekil 2.6)” olarak adlandırılmaktadır [147, 163].



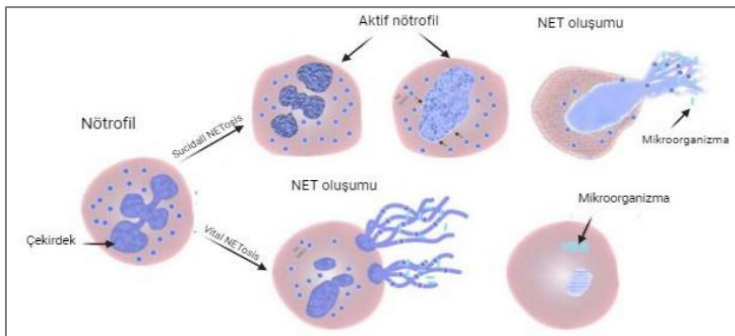
Şekil 2.6. İntihara götüren NETozis immünopatogenezi

Nötrofillerin kemotaksis ve fagositozis gibi bazı işlevleri gerçekleşmemektedir [166]. Reaktif oksijen türleri önemli bir işlev üstlenmektedir. Ayrıca ROS’un yardımıyla NE çekirdeğe girerek histonların parçalanmasını başlatmakta ve bu durum kromatinin dekontensasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca peptidil arginin deiminaz 4 enzimi aktifleşmekte ve histon H3’ün sitrülinsiyonunu destekleyerek kromatin dekontensasyonuna katkıda bulunmaktadır. Trombositler, mikroorganizmalar ve proteinler tarafından tetiklenen NEU’ler 5-60 dakika içinde hayati NETozis oluşturabilmektedir ve buna [177], “yaşamsal NETozis (Şekil 2.7)” olarak isimlendirilmektedir [163].



Şekil 2.7. Yaşamsal NETosis immünopatogenezi

Nükleer DNA, sitoplazma içerisinde tomurcuklanarak hücre zarının yırtılmadan NEU dışına ağlar halinde çıkmaktadır. NEUin parçalanması gerçekleşmemektedir ve nükleusunu kaybetmiş NEU, fagositozis ve kemotaksis gibi fonksiyonel kapasitelerini korumaktadır [163]. Yaşamsal NETosis, genellikle bakteriyel uyarımla tetiklenmekte olup hücre dışı tuzakların oluşumunda NADPH oksidaz aktivitesine veya ROS üretimine ihtiyaç duyulmamaktadır [178]. NEU'ler hayati NETosis sonrasında hayatta kalmakta ve bu süreçte nitrik oksite (NO_x) ihtiyaç duyulmamaktadır [177].



Şekil 2.8. NETosis gelişim mekanizması [179]

Her iki tür NETosis sürecinde de Toll-like reseptör 2 (TLR2) ve komplement faktör 3 (C3), hücre dışı tuzakların oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bu faktörlerin eksik olduğu farelerde hücre dışı tuzak oluşumu gözlemlenmemektedir [20]. Ayrıca MyD88 gibi TLR sinyal yolunun kritik bir unsuru olan bir proteinin yokluğunda farelerde hücre dışı tuzak gelişimi

meydana gelmemekte, bu durum ağların TLR sinyallerine bağlı olduğunu ortaya koymaktadır [180].

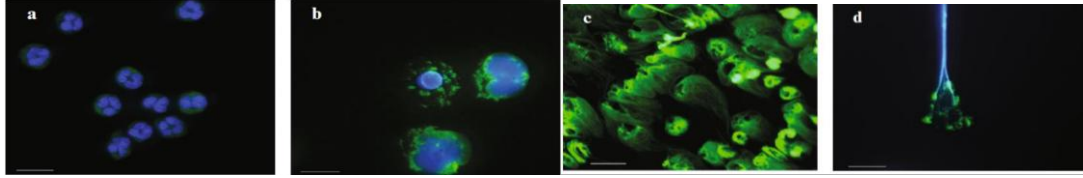
In vitro koşullarda üç farklı hücre dışı tuzak yapısı mikroskop altında tespit edilmiştir; “dağınık” (diffNET), “uzamış” (sprNET) ve “yumak şeklinde” (aggNET). DiffNET’ler, az yoğunluklu bir kromatin kompleksi üzerinde yoğun bir şekilde dağılmış antimikrobiyal proteinlerle süslenmiş yapılar iken, sprNET’ler yoğunlaşmış kromatin ağları ve uzun, pürüzsüz antimikrobiyal protein yapılardan oluşmaktadır. AggNET’ler ise NET benzeri “iplik yumağı” görünümünde kümelenmiş iplik yapılarından meydana gelmektedir [181].

NEU’ler ve lenfositler, çeşitli enflamatuvar hastalıkların patofizyolojisi ile yakından ilişkilendirilmektedir. NEU-lenfosit oranı, bağışıklık sisteminin doğuştan gelen NEU bağlı tepkileri ile lenfositler aracılığıyla sağlanan adaptif bağışıklık tepkilerini bütünleştiren önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir [182]. NETozis süreci, bir dizi ardışık adımdan meydana gelmektedir [146]:

1. ROS üretimi,
2. NE ve ardından miyeloperoksidazın granüllerden çekirdeğe transferi,
3. Histonların modifikasyonu,
4. Sitoplazmik membranın yıkımı ve kromatinin serbest bırakılması şeklinde gerçekleşmektedir.

NETozis için ROS üretiminin zorunlu olduğu belirtilmektedir. NEU’lerde, ROS, NADPH oksidaz kompleksinin katıldığı solunum patlaması sırasında oluşmaktadır [183]. Bu çok bileşenli enzim kompleksi, aktivasyon esnasında özel granüllerin zarlarında ve NEU’lerin sitoplazmik zarında birikerek, sitoplazmada bulunan NADPH’den zar boyunca moleküler oksijene elektron transferini sağlamaktadır. Bu durum, oksijenin süperoksit anyon radikaline dönüşümüyle sonuçlanmaktadır. Bu, kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz aracılığıyla hidrojen peroksit oluşumuna ve ardından redoks dönüşümüne uğramaktadır. Bu birincil ROS, daha etkin metabolitlerin oluşumuna yol açmaktadır. Hipokloröz asit, güçlü bir mikrop öldürücü etkiye sahiptir ve azurofilik granüllerdeki miyeloperoksidaz enziminin katılımıyla meydana gelmektedir. NETozis sürecinin bir diğer özelliği kromatinin ökromatin ve heterokromatin olarak ayrılmasıdır. Bu işlem, azurofilik granüllerde bulunan NE ve miyeloperoksidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu iki enzim, NETozis’in en

erken aşamalarında granüllerden çekirdeğe doğru hareket etmektedir [145]. Ayrıca hücre iskeleti, insan NEU'lerinde NETozis sürecinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Şekil 2.9) [184].



Şekil 2.9. Nötrofillerin NETozis sürecinin düzenlenmesinde rolleri a) Stimüle olmamış insan nötrofili b) Uyarılmış nötrofiller c) Kromatin fibrillerinin hücrenin dışına çıkışı d) Nötrofil tuzağı [185]

Nötrofil elastaz, serin proteaz sınıfına ait bir enzim olup ekstrasellüler NEU tuzakları içerisinde yer almaktadır. NE, NET'ler içinde bulunmanın yanı sıra histonları parçalayarak NETozis sürecinde kromatinin decondansasyonuna katkıda bulunmaktadır. Peptidil Arginin Deiminaz-4 (PAD4), arjinin kalıntıları sitrulin polipeptitlerine dönüştürerek katalize etmektedir. Bu reaksiyon proteinin pozitif yükünü ortadan kaldırmakta ve dolayısıyla kromatinin kompakt yapısını açarak NET'lerin oluşumuna ve dağılımına imkân sağlamaktadır [148]. Ayrıca PAD4 histonların sitrülasyonunu katalizlemek amacıyla sitoplazmadan çekirdeğe taşınmakta ve bu süreç kromatinin decondansasyonuna yol açmaktadır. Peptidil-arginin deiminazlar, Ca^{2+} ile aktive olan ve bu iyonu bağlayan proteinlerdir [176].

2.2.2. NEU kinetiği

NEU'lerin üretim süreci granülopoez olarak adlandırılmaktadır. Kemik iliğinde yer alan hematopoetik kök hücreler önce multipotent progenitör hücrelere (MPP), daha sonra lenfoidle-hazırlanmış MPP'ye (LMPP) ve sonrasında granülosit monosit progenitör hücrelere (GMP) dönüşmektedir. Bu hücrelerin kemik iliğinde kalmasını sağlayan yüksek miktardaki çok geç antijen (VLA) 4 ve CXC reseptör (CXCR) 4, kemik iliği stromal hücrelerinden üretilen vasküler hücre yapışma molekülü (VCAM) 1 ve CXC ligand (CXCL) 12 ile etkileşim göstermektedir [126, 186]. GMP hücrelerinden sırayla dönüşen myeloblast, premyelosit, myelosit, metamyelosit, bant hücre ve segmente NEU'lerde CXCR4 ve VLA-4 düzeyleri azalırken, Toll-benzeri reseptör (TLR) 4 ve CXCR2 düzeyleri artmaktadır.

TLR4'ün birçok ligandı olup bunlar arasında lipopolisakkaritler (LPS) ve viral proteinler bulunurken, CXCR2'nin ligantları ise CXCL1, CXCL2, CXCL5 ve CXCL8'dir [126, 187].

NEU sayısı, vücutta enflamatuvar süreçler geliştiğinde on kata kadar artmaktadır. Enflamasyon dışında kortikosteroid kullanımı, egzersiz ve hiperkolesterolemi gibi durumlar da NEU sayısında artışa yol açmaktadır. Kan dolaşımındaki NEU sayısını artıran mekanizmalar arasında granülosit koloni uyarıcı faktörü (G-CSF) önemli bir rol oynamaktadır [188, 189]. G-CSF, G-CSF reseptörü üzerinden etkisini göstermektedir ve bu reseptörün eksikliği nötropeniye neden olmaktadır. Ayrıca IL-3, IL-6 ve granülosit monosit koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) de granülopoezi teşvik etmektedir. Ancak farelerde yapılan çalışmalarda bu üç molekülün yokluğunda dahi bazal seviyede NEU üretimi sürdüğü gözlemlenmiştir [190, 191, 192].

Granülopoezi etkileyen faktörler iki ana kategoride incelenebilir: Bunlar kemik iliği dışı kaynaklar ve kemik iliği kaynaklı faktörlerdir.

Kemik iliği dışı kaynaklar

Kemik iliği dışından gelen faktörler arasında endotel hücreleri ile makrofaj veya dendritik hücrelerin ve Th17 lenfositlerin etkileşimi öne çıkmaktadır. Endotel hücreleri, CXCL1, CXCL2, CXCL5 ve CXCL8 gibi çeşitli kemokinleri salgılayarak granülopoezi teşvik etmektedir. Ayrıca apoptotik NEU'leri fagosite eden makrofajlar veya dendritik hücreler, IL-23 düzeylerinin düşmesine neden olarak Th17 lenfositler tarafından salınan IL-17'nin artmasına ve dolayısıyla G-CSF'nin salınımını artırarak granülopoezi ve NEU salınımını tetiklemektedir. Düşük IL-17 seviyeleri, G-CSF ekspresyonunu azaltarak NEU'lerin kararlı durumda salınımını sağlamaktadır. Enflamasyon durumunda artan IL-1 ve NEU kaynaklı IL-17 de benzer şekilde granülopoezi uyarmaktadır [193, 126].

Kemik iliği kaynaklı faktörler

Kemik iliği kaynaklı faktörler arasında en önemli düzenleyici G-CSF'dir. G-CSF, megakaryositlerden CXCR2 ligandlarının salınımını artırarak kemik iliği stromal hücrelerinden CXCL12 salınımını azaltır ve NEU'lerde bulunan CXCR4'ün azalmasını sağlayarak granülopoezi düzenlemektedir [126].

Granülopoezdeki artış, NEU sayısında artışa yol açarken farklı nedenler granülopoezi farklı şekillerde etkileyebilir. Örneğin prednizolon ve bakteriyel endotoksinler dolaşım havuzundaki NEU sayısını artırırken; egzersiz ve adrenalin marjinal NEU havuzundan serbest dolaşan NEU havuzuna doğru bir kaymaya neden olmaktadır [194].

2.2.3. NET formasyonu

Son dönemlerde NET oluşumu birçok bilim insanı tarafından yoğun bir şekilde incelenmektedir. Thorhthton ve ark.ları (2013), tekrarlayan AOM (Akut Orta Kulak İltihabı) teşhisi konmuş çocukların orta kulak efüzyon örneklerinde NET oluşumuna bağlı yoğun DNA içeriği ve çeşitli bakteri türlerinden oluşan biyofilmler tespit etmişlerdir. Bu bulgular, orta kulak efüzyonlarının viskozitesini artırarak tedavi sürecini zorlaştırmaktadır. Val ve arkadaşları [195] ise insan KOM (Kronik Orta Kulak İltihabı) vakalarında NET'lerin orta kulak efüzyonlarının temel makromoleküler bileşenleri olduğunu belirlemişlerdir.

S.pneumoniae, NEU granülositler tarafından oluşturulan ekstrasellüler tuzaklarca tutulabilir, ancak diğer pek çok patojenin aksine NET'ler tarafından yok edilmez. Bu bakteriyi NET'lerden kaçabilmesine olanak sağlayan etmenlerden biri pnömokokal nükleaz olan endolükleaz A (endA)'dır. EndA, NET yapılarında bulunan DNA iskeletini bozarak bakterinin tuzaktan sıyrılmasını mümkün kılmaktadır. Pnömokokal akciğer hastalıklarında bakteriler tuzaklardan kaçsalar bile NET formasyonunun enfeksiyonun konakta sınırlanmasına ve patojenin kan dolaşımına yayılma riskinin azaltılmasına katkıda bulunduğu belirlenmiştir [196]. *S. pneumoniae*'nin NET'lerden kaçışını kolaylaştıran bir başka faktör ise pnömolizindir. Pnömolizin, *S. pneumoniae* biyofilm oluşumunun temel bir unsuru olduğu bilinmektedir [197]. Ullah ve vd. [198], pnömolizinin NET'lerin pnömokokları tutma yeteneğini engellediğini ve pnömolizinle indüklenen biyofilm oluşumunun pnömokokların NET'ler tarafından yakalanmasını engellemek için evrimsel bir adaptasyon olabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada deney grubunda yüksek oranda bakteri ve NET varlığı gözlemlenmiştir. NET oluşumu, bölgedeki bakteri varlığını kısıtlamakla birlikte *S. pneumoniae*'nin bu adaptasyonları göz önünde bulundurulduğunda sık tekrar eden otitis media vakalarının NET içerisinde hapsedilmiş bakterilerin kaçarak hastayı yeniden enfekte edebileceği ve biyofilm oluşumunun mümkün olabileceği belirtilmiştir. Biyofilmler ile tekil hücreler arasındaki temel fark, biyofilm oluşturan bakterilerin tekil konumdaki muadillerine göre antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençli

olmalarıdır. Biyofilmlerin bu özgü antibiyotik direnci, biyofilm formasyonunun olduğu vakalarda tedavi zorluğu ve hastalığın kronikleşmesi ile doğrudan ilişkili olmaktadır [199].

2.2.4. Parazitlerde NETozis

Hücre dışı tuzak oluşumu, parazitlerde ilk kez 2008 yılında *Plasmodium falciparum* taşıyan çocuklardan alınan kan örneklerinde Baker ve ark.ları tarafından gözlemlenmiş ve bu mekanizmanın malaria patogeneğinde etkili olabileceği öne sürülmüştür [200]. *Eimeria bovis*, *Besnoitia besnoiti* ve *Toxoplasma gondii* gibi protozoonlar da dahil olmak üzere çeşitli protozoon türlerinde de hücre dışı tuzak yapılarının oluştuğu saptanmıştır [201, 202, 203, 204, 205]. Bu süreç, helmintlerde de rapor edilmiştir [206]. NEU'ler, helmintlerin farklı gelişim aşamalarıyla karşılaştıklarında hücre dışı tuzak oluşumunu tetiklemektedirler. *Schistosoma mansoni* [207], *Strongyloides stercoralis* [208], *Brugia malayi* [209], *Dirofilaria immitis* [181], *Fasciola gigantica* [210], *Strongyloides ratti* [211], *Fasciola hepatica* [212] ve *Echinococcus granulosus* protoskolekslerinin [213] NEU'lerde hücre dışı tuzak yapıları oluşturduğu tespit edilmiştir.

Nematodlar

Çeşitli parazitlerin larvaları, insan, fare, sığır ve koyun kökenli NEU ve makrofajlarla in vitro ortamda inkübe edilmiş ve bu süreçte hücre dışı tuzakların (NET'ler) oluşumu incelenmiştir. *Strongyloides stercoralis* ve *Haemonchus contortus* larvaları insan ve sığır NEU'leri tarafından NET'lerle tuzağa düşürülmüş ancak bu yapılar genellikle larvaları öldürmemiştir. St. Croix ve Suffolk koyunlarından elde edilen NEU'ler, larva antijenleri ile reaksiyon gösterirken, *Brugia malayi* ve *Nippostrongylus brasiliensis*'in larvaları ile yapılan çalışmalarda NET'lerin larvaları sarmaladığı ancak öldürmediği gözlemlenmiştir. Bu tuzakların, özellikle *Dirofilaria immitis* ve *Ostertagia ostertagi* gibi diğer parazit türlerine karşı da benzer tepkileri tetiklediği belirlenmiştir. *Trichinella spiralis*'in larvalarının ise, NET'lerin yanı sıra serin proteaz inhibitörleri ile konak savunmasını etkisiz hale getirdiği saptanmıştır. *Necator americanus* ise NET yapısını bozan DNase-II enzimi salgılamıştır. Araştırmalar, parazitlerin ev sahibi bağışıklık sistemi ile karmaşık etkileşimler içinde olduğunu ve bazı durumlarda NET'lerin enfeksiyonun yayılmasını engelleyebileceğini göstermektedir. *Wolbachia* bakterileri (Rickettsiaceae) gibi endosimbiyotik bakterilerin

varlığı, bazı nematodların hayatta kalmasına katkı sağlamakta ve onların NEU tepkisini etkilemekte olduğu bulunmuştur [208, 214, 211, 209, 215, 216, 217, 181]

Trematodlar

Schistosoma japonicum'un insan kökenli NEU'lerle etkileşimi incelenmiş ve bu süreçte NEU'lerin proenflamatuvar sitokin ve kemokinler üretiminde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu NEU'ler 659mitokondriyal DNA ve matris metaloproteinaz 9 proteazının salımını tetiklemiştir. Ancak hücre dışı tuzakların (NET'ler) yumurtaları öldürmediği tespit edilmiştir [207]. Farklı bir çalışmada, *Fasciola gigantica*'nın genç formlarının manda kökenli PMN hücreleri ile etkileşimi sonucu NET'lerin salgılanmasına neden olduğu belirlenmiştir, ancak bu tuzaklar genç parazitlerin canlılığını etkilememiştir [210]. *Fasciola hepatica*'nın farklı evrelerinin sığır kökenli PMN hücreleri ile etkileşiminde NETozis'in zayıf bir şekilde indüklenmesi gözlenmiş, ancak bu tuzaklar parazitik evreleri öldürmemiştir. Ayrıca, *Fasciola hepatica*'nın NET'leri parçalayarak veya NETozis sinyal yollarını bozarak PMN aktivasyonundan kaçınabileceği belirtilmiştir [212]. Munoz-Caro ve ark.ları [214] ise *F. hepatica* antijeni'nin koyun PMN hücrelerini etkileyerek NET oluşumunu ve ROS üretimini tetiklediğini bildirmiştir. Wang ve ark.ları (2022) tarafından yürütülen bir araştırmada ise, *S. japonicum* ile enfekte olmuş farelerden elde edilen hücre dışı veziküllerin (EV'ler) NET üretimini artırdığı ve bu sürecin farelerde NEU kaynaklı NET oluşumunu hızlandırdığı tespit edilmiştir.

Sestodlar

Echinococcus granulosus, zoonotik bir sestod olup ara konakların dokularında kist hidatid adı verilen larval formasyonlara yol açmaktadır. Bu larvalar içerisinde mikroskopik protoskoleks yapıları barındırmaktadır. Kist hidatidlerin çeşitli nedenlerle ya da cerrahi müdahaleler sırasında patlaması halinde içlerindeki protoskoleksler konak vücudunun boşluklarına yayılarak yeni kistlerin oluşumuna neden olabilmektedir. NEU'ler, bu tür bir vücut reaksiyonu sırasında yangı bölgesine ilk ulaşan hücrelerdir. Yıldız ve ark.ları [218] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada koyun kaynaklı PMN hücreleri ile *E. granulosus* protoskolekslerinin in vitro ortamda inkübasyonu sonucu, histon (H3), MPO ve NE ile kaplı hücre dışı tuzak yapıları tespit edilmiştir. İnkübe edilen protoskolekslerden bazılarının lizise uğradığı ve serbest kalan kitinöz çengellerin bu ağlar tarafından çevrelenmiş olduğu

gözlemlenmiştir. Protoskoleks sayısı ile ekstrasellüler DNA miktarı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ancak inkübasyon süresi arttıkça ekstrasellüler DNA miktarında bir artış gözlenmiştir. Kist sıvısının koyun PMN hücrelerinde hücre dışı tuzakların gelişim üzerinde negatif bir etkisi olduğu belirlenmiştir.

2.2.5. Bakteri, mantar ve virüslerde NETozis

NETozis reaksiyonunun mantarlar, bakteriler ve virüslerle mücadelede geliştiği Timar, Lőrincz ve Ligeti [219] tarafından rapor edilmiştir. Bu reaksiyonların patojenleri hem etkisiz hale getirdiği hem de sınırlandırdığı gözlemlenmiştir [163]. Mevcut bulgular, NET oluşumunun belirli bakterilere karşı tetiklendiğini ancak NETozis'i indükleyen patojenlerin özelliklerinin daha detaylı incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Bakterilerin enfeksiyon oluşturma ve bağışıklık sisteminden kaçabilme yetenekleri, virülans faktörleri olarak adlandırılan ve bu faktörlerin ifadesine bağlıdır. Bu virülans faktörleri ile hücre dışı tuzaklar arasında karmaşık bir etkileşim bulunmaktadır [20].

Candida albicans gibi bazı mantar türlerinin de hücre dışı tuzaklar tarafından etkisiz hale getirildiği belirlenmiştir [220]. Virüslere karşı NEU'lerin etkin hücreler olarak kabul edilmemesine rağmen viral enfeksiyonlarda hücre dışı tuzakların rolüne dair sınırlı bilgi bulunmaktadır [20]. HIV virüsünün NETozis'i indüklediği, Feline leukemia virüsü (FLV) ve İnfluenza virüslerine karşı hücre dışı tuzak oluşumunun incelendiği tespit edilmiştir [221, 222, 223]. Zuo ve ark.ları [224], COVID-19 hastalığı nedeniyle yatırılan hastaların serumlarında NET belirtecini düzeylerinin yükseldiğini rapor etmişlerdir.

2.2.6. NETozis temelli tedavi seçenekleri

Asetilsalisilik asit; antitrombotik ve antienflamatuvar özelliklere sahip, steroid olmayan bir ilaçtır. Bu ilaç, siklooksijenaz enzimini geri dönüşümsüz bir şekilde asetillenerek prostoglandin sentezini engellemekte ve platelet fonksiyonlarını inhibe ederek platelet-NEU etkileşimini bozmaktadır. Böylece NET oluşumu engellenmektedir [225, 226, 227].

Kloramidin; protein arjinin deiminazını (PAD) kalıcı olarak bloke etmek için geliştirilmiş bir bileşiktir. PAD4, NETozis sürecinde yer alan bir enzimdir ve bu nedenle PAD4'ün inhibisyonu potansiyel bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir [228, 229].

Antibiyotikler; bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta ve bağışıklık hücreleri üzerinde NEU'ler dahil, immünmodülatör etkiler göstermektedir [230, 231].

N-asetilsistein (NAC); kronik obstrüktif akciğer hastalıklarında ve bronşektazi tedavisinde kullanılan bir mukolitikdir. Ayrıca ROS ile ilişkili birçok hastalıkta antioksidan etki göstermektedir. NAC, doza bağlı olarak NETozis'i azaltmak için ROS üretimini baskılamaktadır [232].

Vitamin D; NET oluşumunu ve hasarlı endotel hücrelerinin sayısını azaltarak etki göstermektedir. D vitamini, immünomodülatör bir ajan olarak özellikle D vitamini eksikliği olan SLE hastalarında endotel hasarını önlemek için terapötik bir seçenek olarak kullanılmaktadır.

2.2.7. NETozis ve ilişkili hastalıklar

Antimikrobiyal işlevlerinin yanı sıra, NETozis pek çok enflamatuvar ve otoimmün hastalığın nedenleri arasında gösterilmektedir [146]. Koagülasyon, vücutta meydana gelen yaralanmalar sonucu kan kaybının azaltılmasına yardımcı olmakta, aynı zamanda patojenlerin vücut içerisinde yayılmasını engelleyen bir süreç olarak işlev görmektedir [233]. Bu süreçte NEU'ler, pıhtı oluşumuna katkıda bulunmakta ve hücre dışı tuzak yapılarının oluşumunda aktif bir rol üstlenmektedir. NEU'ler ve bu hücre dışı tuzaklar, pıhtılaşma faktörleri ve damar endotel hücreleri ile etkileşerek işlevlerini yerine getirmektedir. Ayrıca hücre dışı tuzakların sahip olduğu bakterisidal etkisi, patojenler üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır [146]. Bu etkileşimler sırasında aktif hale gelen kan pulcukları, NEU'leri hücre dışı tuzak yapıları oluşturmaya teşvik etmekte ve böylece venöz trombozların oluşumuna neden olmaktadır [133].

Venöz dolaşımda yaşanan durgunluk ve düzensizlikler, derin ven trombozu (DVT) oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Gebelik, obezite, travma ve bazı kanser tipleri gibi faktörlerin DVT riskini artırdığı bilinmektedir [20]. Hücre dışı tuzakların dolaşımda iskele oluşturduğu ve endotel hücreleri, trombositler ve alyuvarlar ile etkileşime geçerek damar içi tromboz oluşumunu desteklediği gözlemlenmiştir [234]. Damar endotel hücrelerinden salınan IL-8 ve reaktif oksijen türleri, NEU'leri hücre dışı tuzak oluşumuna yönlendirmekte, NET yapısında bulunan histonların endoteliyal membranlara bağlanmasıyla bu

membranlarda hasar oluşmaktadır [235]. Ayrıca histonlar kan plazmasındaki antikoagülan faktörleri inhibe ederek trombus oluşumunu arttırmaktadır [236]. Venöz tromboz oluşumlarının deoksiribonükleaz müdahalesiyle önemli ölçüde azaltıldığı tespit edilmiştir. DVT'nin etiyolojisinde hücre dışı tuzakların varlığının ve bunların ortadan kaldırılmasının daha iyi anlaşılması, çeşitli immün hastalıkların tedavisinde yeni yöntemlerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır [237].

Kistik fibrozis, Avrupa kökenli oldukça yaygın bir genetik hastalık olarak bilinmekte ve hastaların akciğerlerinde *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi mikroorganizmaların kolonizasyonunu teşvik eden yoğun ve yapışkan mukus birikimi ile tanımlanmaktadır [133]. Kistik fibrozisli hastaların balgamında hücre dışı tuzak yapılarının varlığı saptanmıştır [238]. Hastaların balgamında NEU'lerin antimikrobiyal granül içeriklerinden elastaz ve MPO'nun yüksek düzeylerde olduğu gözlenmiş ve bu enzimlerin akciğer epiteli üzerinde zararlı etkiler yarattığı düşünülmüştür (Ratjen, 2008). NEU'lerden kaynaklanan elastazın, akciğer epitel hücrelerine zarar verdiği ve mukusun yapısını değiştirdiği, ayrıca proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu tetiklediği tespit edilmiştir [239]. Bu nedenle NETozis yoluyla NEU elastazının hücre dışına salınımı, kistik fibroziste akciğer dokusunda hasarın başlıca nedenlerinden biri olabileceği ve hastalığın ilerlemesini hızlandırabileceği düşünülmektedir [240].

Preeklampsi, gebeliğin yaklaşık 20. haftasında ortaya çıkan ve annenin ve fetüsün hayatını tehdit eden nöbetlerle birlikte seyreden ciddi bir durum olarak tanımlanmaktadır. Proteinüri, ödem ve kan basıncının yüksek seviyelere ulaşması ile karakterize edilmektedir [241]. Preeklampsi teşhisi alan gebe kadınlar için sıklıkla erken doğum yöntemi tercih edilmektedir [242]. Preeklampsi, maternal dolaşımda yoğun plasental mikro artıklar ile ilişkilendirilmektedir [20]. Bu mikro artıkların NEU'leri aktive ettiği ve hücre dışı tuzak yapısını teşvik ettiği gözlenmiştir [243]. Preeklampsi sırasında hücre dışı tuzak yapılarının artışı, artan hücre dışı DNA düzeylerini de açıklayabilir, bu DNA düzeyleri hastalığın şiddeti ile doğru orantılıdır. Bu bağlamda hücre dışı tuzak yapılarının preeklampsianın etiyolojisinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Preeklampsi sırasında hipoksi-reperfüzyon hasarı ile karakterize edilen durumda, anne ile fetüs arasındaki dolaşımı sağlayan damarlarda bulunan hücre dışı tuzaklar, fetüsün oksijen alışverişini olumsuz etkilemektedir [244]. Ayrıca vücutta tromboz oluşumunu teşvik eden

hücre dışı tuzaklar, epitel ve endotel hasarı oluşturarak durumu daha da kötüleştirebilmektedir [241]. Preeklampsik plasentada aşırı fibrin birikimi ve dolaşım bozuklukları, enfarktüs görülme sıklığını artırmakta, bu durum yukarıda belirtilen hasar ihtimalini pekiştirmektedir. Plasental mikro-debrislerin intervillus alanında hücre dışı tuzak yapılarının salınımını tetikleyebileceği öne sürülmüştür [20].

Gut artriti sırasında eklem içinde monosodyum urat kristallerinin birikimi sonucu iltihaplanma oluşmaktadır [20]. Akut gut hastalığına sahip bireylerden alınan serum ve eklem sıvılarındaki monosodyum urat kristalleri tespit edilmiştir [245]. Bu kristallerin, NEU'leri hücre dışı tuzak oluşturulması yönünde tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca NET'lerin vücuttan atılmasında yaşanan zorluklar nedeniyle eklemlerde biriktiği ve bu birikimin yangıya yol açtığı belirlenmiştir [20].

Psoriasis, deri ve diğer organlarda yaygın görülen yangısal bir rahatsızlık olup, IL-17 sitokininin bu süreçte önemli bir etkisi bulunmaktadır [165]. Psoriasis dönemlerinde deri üzerinde IL-17'nin NEU ve mast hücreleri tarafından salgılanması teşvik edilmekte ve bu sitokin, özellikle NETozis süreci sırasında aktif olarak salınmaktadır [246]. Bu bağlamda NEU'ler tarafından oluşturulan hücre dışı tuzaklar ile IL-17'nin salınımı, psoriasis patogenezi içerisinde etkin bir rol oynamaktadır [165]. Yapılan araştırmalar, psoriasisli hastaların periferik kanlarında, sağlıklı bireyler ve egzamalı hastalara göre daha fazla NET oluştuğunu göstermektedir. NET miktarı ile psoriasis şiddeti arasında paralel bir ilişki saptanmıştır. Ayrıca hücre dışı tuzaklar oluşturan NEU'ler, sıklıkla epidermis içerisinde psoriatik plaklarda yer almaktadır [247].

Anti-NEU sitoplazma antikorları (ANCA), küçük damar vaskülitisi olan bireylerde hastalıkla ilişkilendirilen belirgin antikorlar olarak tanımlanmaktadır [248]. ANCA, NEU'lerin granül proteinleri olan proteinaz-3 (PR3) ve Miyeloperoksidaz (MPO) gibi yapılarına karşı oluşmakta ve NEU'lerden salınan enzimler ile reaktif oksijen türlerinin endotel hücrelerinde yangıya sebep olmasına yol açmaktadır [147]. NET oluşumu, hastalığın seyri ve NEU sayısı ile pozitif bir ilişki içinde gözlemlenmektedir. ANCA tarafından aktive edilen NEU'ler, NET oluşturmakta ve bu süreçte bazı otoantijenlerin salınımına neden olmaktadır [248].

Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) bağlamında, NETozis sürecinden geçen NEU'ler tarafından salınan nükleik asitlere karşı otoantikor üretimi olasılığı bulunmaktadır [249]. Romatoid Artrit (RA) konusunda yapılan çalışmalar, RA hastalarında dolaşımdaki NEU'lerin sağlıklı bireylere göre daha kolay NETozis'e uyarıldığını göstermiştir [250, 251].

Tip-1 Diyabetes Mellitus (T1DM) durumunda, hiperglisemi sonucu üretilen sitokinler, NEU'lerin enflamasyon bölgesine çekilmesine neden olarak otoimmün diyabet sürecinin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır [252]. Gut hastalığında ise, eklemlerde biriken monosodyum urat kristalleri, lökositleri çekerek ve NET'lerin iltihaplanmayı teşvik etmesini sağlayarak bağışıklık tepkilerini harekete geçirmektedir [131].

İnflamatuvar Barsak Hastalıkları bağlamında, özellikle Crohn hastalığında NET oluşumu yeterince incelenmemiştir; ancak yapılan araştırmalar, ROS üretiminin arttığını ve bunun NETozis'i destekleyebileceğini göstermektedir [253, 254]. Tip-2 Diabetes Mellitus'ta ise, metabolik bozukluklar genellikle kronik ve düşük seviyede enflamasyon ile ilişkilendirilir. Hiperglisemik koşullar, hem tip-1 hem de tip-2 Diabetes Mellitus hastalarında NET oluşumunu tetiklemektedir [159].

Obezite ile ilgili yapılan çalışmalar, artan NEU aktivitesi, süperoksit radikalleri ve NET oluşumunun obezite ile kronik enflamasyon arasında bir bağ olduğunu ortaya koymaktadır [255]. Sepsis sürecinde NETozis mekanizması da önemli bir işlev görmektedir. Bu nedenle, sepsis tedavisinde NET oluşumunu inhibe etmek amacıyla yeni tedavi seçenekleri kullanılabilmektedir [256, 257].

2.2.8. NET'lerin doku hasarındaki rolü

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ve invazyon ile karakterize ölümcül hastalıklardan biridir. Son dönem araştırmalar, NETozis'in kanser ilerlemesi ve metastaz ile yakın ilişkili olduğunu göstermiştir [258]. Tümör hücreleri ve onların mikroçevreleri NETozis'i tetikleyebilmektedir. NET oluşumu, solid tümörler tarafından yaratılan ve yüksek düzeyde hipoksi ile indüklenen faktör-1 α içeren hipoksik ortamlardan kaynaklanmaktadır. Lewis akciğer karsinomu modelinde hemorajik tümörlerde geniş NEU alanları ve NET benzeri yapılar gözlemlenmiştir, bu bölgeler NET oluşumuna hazır hipersitruinli NEU'ler içermektedir [259]. Fare insülinoma ve meme kanseri modellerinde periferik dolaşıma

ulaşan NET birikimleri, tümör hücreleri tarafından etkilenmemiş organlarda sistemik enflamasyon ve damar fonksiyon bozukluğuna yol açmıştır. DNaz I tedavisi, bu uzak etkileri azaltarak NET'lerin distal organlardaki tümörler üzerindeki yan etkilere aracılık ettiğini göstermiştir [260]. Meme kanseri olan hastaların karaciğer metastazlarında yüksek NET seviyeleri bulunmuş ve serum NET'leri, erken evre meme kanseri olan hastalarda karaciğer metastazlarının başlangıcını öngören bir gösterge olarak tanımlanmıştır [261].

NET'lerin kanserin türüne, bağışıklık sisteminin durumuna ve tümörün yer aldığı çevreye bağlı olarak kanserin büyümesini destekleyebileceği veya inhibe edebileceği belirtilmiştir [261]. Ayrıca, artan araştırmalar NET'lerin çeşitli otoimmün ve alerjik rahatsızlıklar dahil bir dizi patolojik durumda temel doğuştan bağışıklık tepkilerinin merkezinde yer aldığını ortaya koymuştur [262]. Özellikle, NET kaynaklı pıhtılaşma, bazı kanser türlerinin bir belirtisi olup, DNaz ile tedavi edilerek azaltılabileceği gösterilmiştir [263]. Bununla birlikte, NET'lerin ve NEU'lerin işlevleri kanser türüne ve ilerleme düzeyine göre değişiklik gösterebilir; NET'ler tümör hücrelerini doğrudan öldürme veya bağışıklık sistemini tümörle mücadelede harekete geçirme yoluyla kanser önleyici bir işlev görebilir [159].

2.2.9. NET'lerin otoimmünitede ve sistemik otoenflamasyondaki rolü

NEU granulositler, kanda en yaygın bulunan lökosit türüdür [264]. Bu hücreler, vücuda giren çeşitli patojenleri enfeksiyon alanında sınırlayarak yayılmalarını önlemekte olan doğal bağışıklık sisteminin temel unsurlarıdır [237]. Enfeksiyon bölgesine yönelen NEU'ler, fagositozis ve degranülasyon gibi stratejilerle patojenlere karşı mücadele etmektedir [147]. Ayrıca NEU'lerin patojenlere karşı "NETozis" adı verilen farklı bir savunma stratejisi de kullandığı saptanmıştır [19]. Karşılaşılan patojenlerle veya belirli moleküllerle etkileşim sonucu NEU'lerde başlayan reaksiyonlar, granül ve çekirdek içeriğinin hücre dışına salınmasına yol açmaktadır [20]. NETozis süreci sırasında 'hücre dışı tuzak yapıları' olarak bilinen NET oluşmaktadır. Bu yapıların ana görevi, patojenleri enfeksiyon bölgesinde fiziksel olarak hapsederek yayılmalarını engellemek ve histonlar, granüler enzimler ile bazı sitoplazmik proteinler (laktoferrin ve katepsinler) aracılığıyla antibakteriyel etki sağlamak ve virülensi azaltmaktır [133]. Yanlış zaman veya bölgede NETozis gerçekleştiğinde veya organizmada oluşan hücre dışı tuzakların uzaklaştırılması ile ilgili bir bozukluk meydana geldiğinde istenmeyen durumlar ortaya çıkmaktadır [265, 166]. NETozisin otoenflamasyon ve bazı otoimmün hastalıkların etiyolojisinde etkili bir rol oynadığı tespit edilmiştir [132].

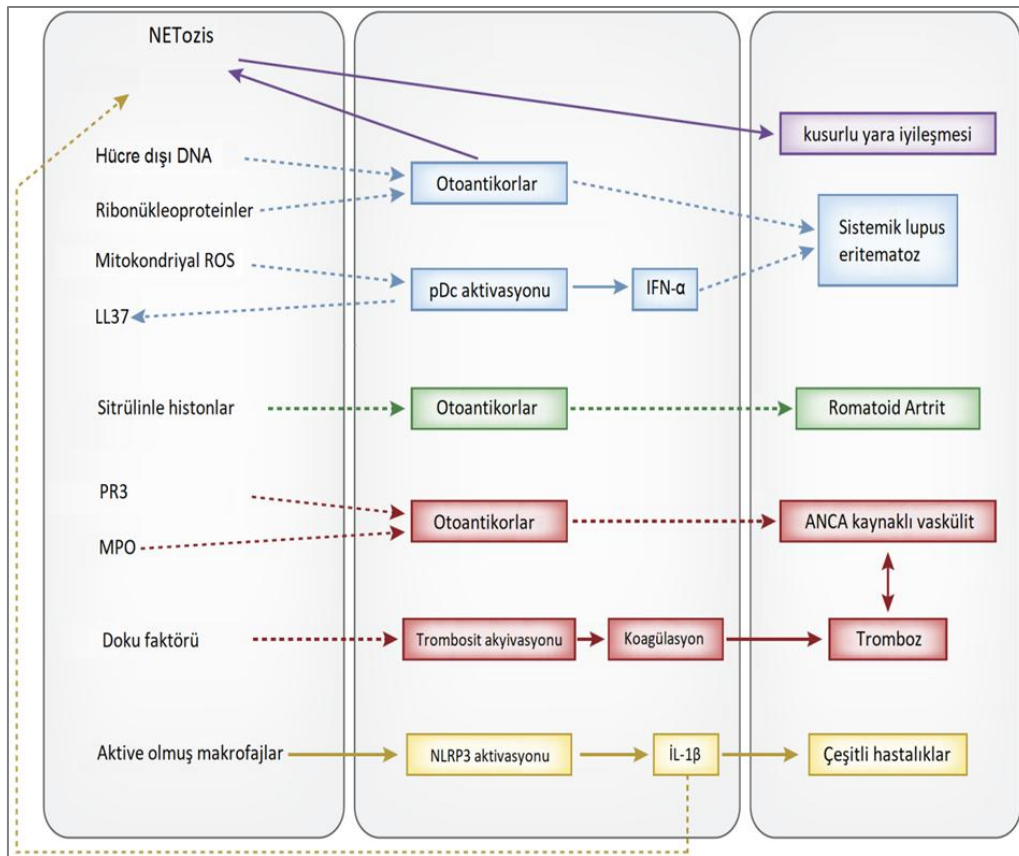
Otoenflamasyonda NETozis, otoenflamasyon ve otoimmün hastalıkların doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin, özellikle makrofajlar ve NEU'lerin, organizmada doku hasarına yol açan iltihabi süreçlerde aktif rol almasıyla karakterize edilmektedir [266]. Otoimmün hastalıklar ise doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık sisteminin bileşenlerinin kendi antijenlerine karşı tolerans kaybı ve buna bağlı otoantikorların salınımı ile dokularda iltihap ve hasara neden olmaktadır [246]. Daha önce tek bir hastalık grubu olarak düşünülen otoenflamasyon ve otoimmün hastalıklar günümüzde iki farklı kategori olarak ele alınmaktadır [267]. Vücutta meydana gelen NETs yapılarının makrofajlar tarafından uygun sürede ortadan kaldırılamaması, bu hastalıkların oluşumunda önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır [268].

Enflamatuvar süreçlerin tetikleyicisi olarak patojenlerin rolü ve NET'lerin immün yanıt mekanizmaları içerisindeki etkinlikleri çeşitli bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlara yanıt olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi bakteriler, NET formasyonunu belirgin bir şekilde ortaya çıkarırken, bu sürecin bakteriyel sepsis gibi ciddi patolojilere yol açtığı belirtilmektedir. *Staphylococcus aureus*'un çeşitli virülans faktörleri, NET formasyonunu destekleyen oksidatif olmayan yollar aracılığıyla immün sistemden kaçınma yeteneğine sahipken, *E. coli*'nin sepsis kaynaklı şok durumlarında NET'lerin oluşumunu tetiklediği gözlemlenmiştir. Ayrıca *Mycobacterium tuberculosis* ve *Clostridium difficile* gibi diğer patojenlerin de NET formasyonunu etkileyebildiği ve bu sürecin hastalığın şiddeti ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir [253].

NET'ler, aynı zamanda antimikrobiyal savunmanın yanı sıra otoimmün ve otoenflamatuvar hastalıkların gelişiminde de etkili olmaktadır. Bu bağlamda sistemik lupus eritematozus (SLE) ve romatoid artrit (RA) gibi hastalıklarda NET'lerin aşırı oluşumu veya yetersiz yıkımı, doku hasarına ve hastalığın şiddetinin artmasına yol açmaktadır. İmmün sistemin bu etmen mekanizması bazen konakçıya zarar vererek otoantijen kaynakları oluşturur ve anti-NEUik sitoplazmik antikorların (ANCA) üretimini teşvik etmektedir. Bu durum, akut böbrek hasarı, lupus nefriti ve küçük damar vaskülitleri gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir [269]. Özellikle AA ve AAA gibi kalıtsal otoenflamatuvar hastalıkların patogeneğinde NET'lerin önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bu hastalıklar, pyrin proteinini kodlayan MEFV gen mutasyonları ile ilişkilidir ve tekrarlayan enflamatuvar ataklarla karakterize edilmektedir. AA ve AAA sırasında NEU'lerden salınan NET'ler, IL-

IL-1 β biyoaktivitesinin artmasına ve enflamatuvar atakların tetiklenmesine katkıda bulunmaktadır. Bu süreçler, NEU'lerin biyoaktif IL-1 β taşıyan kromatin filamentlerini salmasıyla ilişkilidir ve hastalık atakları sırasında NET oluşumu için otofaji mekanizmasının gerekli olduğu gösterilmiştir [22, 245].

NETozis süreci, hücre dışı DNA, ribonükleoproteinler, mitokondriyal ROS, LL37, sitrülünle histonlar, PR3 ve MPO gibi çeşitli moleküllerin salınımını içermektedir. Bu süreç, moleküller, otoantikorlar, pDc aktivasyonu ve IFN- α üretimi gibi bağışıklık yanıtlarını tetiklemekte ve bu da çeşitli otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır. Özellikle NETozis tarafından başlatılan otoantikorlar, Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) ve Romatoid Artrit (RA) gibi hastalıkların gelişiminde etkilidir. IFN- α 'nın üretimi, bu otoimmün hastalıkların ilerlemesinde önemli bir faktördür ve plazmasitoid dendritik hücrelerin aktivasyonu ile ilişkilidir. NETozis'in aktivasyonu sonucu salınan IL-1 β ve NLRP3 inflamazom aktivasyonu çeşitli hastalıkların (Şekil 2.10) gelişimine katkıda bulunmaktadır.



Şekil 2.10. Otoimmün hastalıklarda netozis basamakları [270]

2.2.10. NETozis ölçüm metodları

NETozis, nötrofillerin ekstraselüler tuzaklar saldığı bir süreçtir ve bu süreç farklı yöntemlerle ölçülebilir.

Doğrudan Yöntemler [271, 272]:

- İmmüno Floresan Mikroskopisi: Flüoresans elektron mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) gibi teknikler, NET oluşumunu yüksek çözünürlükte görüntülemek için kullanılır. Bu yöntemler, nötrofillerdeki yapısal değişiklikleri (örneğin, kromatin dekondestasyonu ve ekstraselüler DNA salımı) ayrıntılı bir şekilde incelemeye olanak tanır. Ancak, bu yöntemler zaman alıcı ve gözlemciye bağımlıdır [273, 274]. NET'lerin görselleştirilmesi ve miktarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılır. DNA'yı görselleştirmek için interkale edici boyalar ve NET bileşenleri için spesifik antikolar kullanılarak NET'lerin morfolojik yapısı detaylı olarak analiz edilebilir. Bu yöntem, in vitro, ex vivo ve in situ örneklerde NET oluşumunun farklı aşamalarını ayırt etme avantajı sunar. Ancak, prosedür zaman alıcıdır ve dikkatli örnek hazırlığı gerektirir. Ayrıca, sonuçların gözlemciye bağımlı olması, veri tekrarlanabilirliğini azaltabilir. Yazılım tabanlı analizlerle daha objektif sonuçlar elde edilebilir, ancak bu da ek uzmanlık ve donanım gerektirir [275].
- Akış Sitometrisi: DNA, modifiye histonlar ve granül enzimleri (örneğin MPO ve NE) gibi spesifik işaretleyicilerin tespitiyle NETozis'u ölçer. Hızlı, kantitatif sonuçlar sağlar ve nötrofil popülasyonlarını ayırt edebilir. Ayrıca multispektral görüntüleme veya belirli DNA boyaları (örneğin SYTOX Green) ile birleştirilebilir [273]. NET oluşumunu belirli biyomarkerler (örneğin MPO, NE) ile tespit eder ve hücre popülasyonlarını analiz eder [274]. Akış sitometrisi, hızlı, kantitatif ve objektif bir yöntem olarak NETozis araştırmalarında kullanılır. Pre-NETotic hücrelerin tespiti ve farklı hücre popülasyonlarının ayrıştırılması konusunda etkilidir. Bununla birlikte, bu yöntem serbest bırakılmış NET'leri veya kalıntıları tespit edemez. Ayrıca, örnek hazırlığında yüksek hassasiyet ve özen gerektirir. Akış sitometrisi, özellikle hücrelerin aktivasyon durumunun hızlı bir şekilde analiz edilmesi gereken durumlarda tercih edilir [275].
- Multispektral Görüntü Akışı Sitometrisi (MIFC): Hücresel morfolojiyi incelemek ve farklı hücre ölüm mekanizmalarını ayırt etmek için hızlı ve yarı otomatik bir yöntemdir.

NETozis sürecini analiz etmek için kullanılabilmesine rağmen, mevcut yöntemlerden daha az NETotic hücreyi tespit edebilir. Ayrıca, sofistike ve pahalı ekipman gereksinimi yöntemin erişilebilirliğini sınırlar. Bu yöntem, özellikle hücre morfolojisinin detaylı bir şekilde incelenmesi gerektiğinde uygundur.

- Gerçek Zamanlı Görüntüleme: IncuCyte ZOOM gibi platformlar, NETozis geçiren nötrofilleri gerçek zamanlı olarak izler. Bu platformlar, hücre morfolojisindeki değişiklikleri ve hücre ölüm mekanizmalarını floresan sinyalleriyle değerlendirir [273]. NET'lerin detaylı görselleştirilmesinde etkili bir yöntemdir. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), NET'lerin yüzey yapısını incelemek için kullanılırken, Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), hücre içi yapıları incelemek için tercih edilir. SEM, yüksek çözünürlük ve 3D görüntüleme avantajı sağlarken, TEM ile NET'lerin bakterilerle olan etkileşimleri de detaylı olarak incelenebilir. Ancak, örnek hazırlığı karmaşık ve maliyetlidir. Ayrıca, elektron ışınının örnek üzerinde yapısal değişikliklere yol açma riski bulunmaktadır. Bu yöntem, özellikle NET'lerin fibrin gibi diğer yapılarla karıştırılmaması gerektiğinde tercih edilir [275].
- Western blot, NET bileşenlerinin protein düzeyinde spesifik ve hassas bir şekilde tespit edilmesine imkân tanır. Örneğin, CitH3, MPO veya NE gibi NET belirteçleri bu yöntemle analiz edilebilir. Ancak, çok adımlı bir protokol gerektirmesi ve antikor konsantrasyonlarının optimize edilmesi zorunluluğu, yöntemin zaman alıcı olmasına neden olur. Yöntem, NETozis sürecine dair yarı-kantitatif bilgiler sağlamak için kullanılabilir, ancak diğer yöntemlerle desteklenmesi gerekebilir [275].
- In-vivo ve In-situ Yöntemler: Bu yöntemler, hayvan modellerinde intravital mikroskopi kullanarak nötrofillerin canlı görüntülenmesini içerir. NET oluşumunu gerçek zamanlı izlemek için floresan bazlı boyalar kullanılır [273, 274].
- Canlı hücre görüntüleme, NETozis'in dinamik bir süreç olarak gerçek zamanlı gözlemlenmesine olanak tanır. Genellikle konfokal veya multiphoton mikroskopi kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntem, NET bileşenlerinin farklı floresan boylarla işaretlenmesiyle uygulanır. Bu teknik, in vivo bağlamda NET yapılarının detaylı incelenmesini sağlar. Ancak, karmaşık ve pahalı ekipman gerektirmesi yanı sıra, yanlış pozitif sonuçlara yol açabilecek teknik sınırlamalara sahiptir. Örneğin, hücre membran bütünlüğünün bozulduğu durumlarda, NET oluşumu dışında başka süreçler de gözlemlenebilir [275].

Dolaylı yöntemler [271, 272]:

- **ELISA:** Bu yöntem, plazma veya serum örneklerinde MPO-DNA kompleksleri veya H3Cit (sitrüle histon) gibi NETozis işaretleyicilerini tespit eder. ELISA, klinik ortamlarda NETozis ile ilişkili hastalıkları izlemek için yaygın olarak kullanılır [273]. NETozis'tan salınan spesifik proteinler (örneğin MPO-DNA kompleksleri) ölçülerek dolaylı bir analiz yapılır [274]. ELISA, NETozis'in ölçülmesinde sıkça kullanılan, kolay uygulanabilir ve maliyet etkin bir yöntemdir. NET belirteçlerini tespit etmesi sayesinde klinik araştırmalarda yaygın olarak kullanılır. Örneğin, nükleozomlar, sitrulline histon H3 (CitH3), miyeloperoksidaz (MPO) ve nötrofil elastaz (NE) gibi biyobelirteçler ELISA ile ölçülebilir. Ancak, bu belirteçler yalnızca NETozis'e özgü olmayabilir; apoptoz veya nekroz gibi diğer hücre ölüm mekanizmalarından da kaynaklanabilir. MPO-DNA kompleksleri gibi bazı biyobelirteçler, in vitro NET tespiti için uygun olsa da in vivo ortamda özgüllüğünü kaybedebilir. Ayrıca, ELISA sonuçlarının standartlaştırılması ve farklı kitler arasındaki uyumsuzluklar, yöntemin önemli sınırlamalarıdır [275].
- **Kantitatif PCR ve DNA Bağlama Boyaları:** PicoGreen boyası, çift zincirli DNA'ya bağlanarak ekstraselüler DNA salımını ölçer ve NET oluşumunun bir işaretçisi olarak kullanılır [273, 274].

NETozisin altın standart bir belirteci veya altın standart NETozis tespit yöntemi henüz belirlenemediğinden, araştırmacılar, yapacakları çalışmaya göre ilgili yöntemin üstünlük ve yetersizliklerini göz önünde bulundurarak duruma en uygun belirteci veya yöntemi seçmelidir. Bizim çalışmamızda NET formasyonu için NETozis Test Kiti kullanılmış ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

2.3. Alfa-1 Antitripsin

2.3.1. Alfa-1 antitripsin proteini

SERPINA1 geninin ürettiği ürün olan AAT, 394 amino asitten meydana gelen ve 52 kDa ağırlığında bir plazma glikoproteinidir. AAT molekülü, dolaşıma salınmadan önce 24 amino asitlik bir sinyal peptidinin çıkarılması ve 46, 83 ve 247 numaralı asparajin amino asitlerine üç karbonhidrat yan zincirinin bağlanması ile post-translasyonel modifikasyonlara

uğramaktadır [276, 277]. AAT, çoğu dokuda ve vücut sıvısında bulunmakta olan bir akut faz reaktanıdır. Serumda normal düzeyi 100–220 mg/dL veya 20–53 μ M arasında değişmektedir. İnflamasyon, enfeksiyon ve malign hastalıklar sırasında plazma konsantrasyonu normalin üç ila dört katına çıkmaktadır [278, 279]. Dolaşımdaki AAT miktarının artışına neden olan mekanizmalar tam olarak açıklanamamakla birlikte insan NEU'leri, monositleri ve alveolar makrofajları, enflamasyonu tetikleyen maddelere ve NE ile oluşan komplekslere yanıt olarak AAT üretimini artırmaktadır [278].

AAT özellikle hepatositler tarafından yüksek miktarda sentezlenmektedir. Bunun yanı sıra akciğer ve bağırsak epitel hücreleri, bağışıklık hücreleri ve cilt gibi çeşitli dokular tarafından da daha düşük miktarda üretilmektedir [280, 281, 277]. AAT'nin sentezini tümör nekroz faktörü-a (TNF α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proenflamatuvar sitokinler düzenlenmektedir [282].

Proteolitik enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesi ve vücut dengesinin korunması genellikle birkaç sınıfa ayrılan ve plazmada bulunan endojen protein inhibitörleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu inhibitörlerden SERPIN ailesi, plazmada dominant konumda olup a1-antikimotripsin, antitrombin, C1 esterez inhibitörü, alfa 1 antitripsin ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 gibi proteinleri içermektedir. Bu proteinler enflamasyon, koagülasyon, kompleman ve fibrinoliz gibi süreçlerdeki proteinazların kontrolünde önemli roller üstlenmektedir [283, 284, 285].

Akciğer yüzeyi havadaki patojenlere sürekli olarak maruz kalmakta ve bu durum sıklıkla hücrel bağışıklık tepkilerini tetiklemektedir. Bu tepkiler sonucunda akciğer dokusuna proteazlar ve oksidanlar salınmaktadır. Geniş spektrumlu antiproteaz aktivitesine sahip olan AAT, akciğerde yüksek düzeyde bulunmaktadır ve en önemli işlevi bu dokuda serbest bırakılan proteolitik enzimlerin inhibe edilmesidir. Özellikle akciğer matriks bileşenlerini yok etme potansiyeli taşıyan ve en önemli proteaz olan NE için AAT yüksek affiniteye sahiptir [283, 286]. AAT geni, otozomal eş baskın bir Mendel kalıtım modeli ile ebeveynlerden çocuklarına iki alel olarak aktarılmaktadır. Bu genin %85-90 oranında görülen normal alelleri M olarak adlandırılmakta ve bu nedenle bir bireyin normal genotipi MM olarak gösterilmektedir. En sık rastlanan eksiklik alelleri ise S ve Z olarak isimlendirilmektedir. Alfa-1 antitripsin eksikliğinde en yüksek alel frekansları, Kuzey Amerika ve Avrupa'daki beyaz ırkta gözlemlenmektedir [287].

ABD’de tespit edilen alfa-1 antitripsin eksikliği olan hasta sayısı 10.000’den azken, semptomatik alfa-1 antitripsin eksikliğine sahip olduğu tahmin edilen hasta sayısı 60.000 civarındadır [288]. Bu durum, birçok hastanın bronşiyal astım veya sigaraya bağlı kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi yanlış sınıflandırılmış olabileceğini göstermektedir. AAT eksikliği hastalarıyla ilgilenen bazı sağlık profesyonelleri arasında farkındalık eksikliği ve AAT eksikliğinin klinik değişkenliği, KOAH veya karaciğer sirozu gibi yanlış tıbbi teşhislerle sonuçlanan yetersiz tanı ve geri bildirim sorunlarına yol açabilmektedir.

Alfa-1 antitripsin proteininin amino asit diziliminde 342. pozisyonda glutamik asit yerine lizin yer alması ZZ varyantının oluşumuna sebep olmaktadır. Bu değişiklik, proteinin üçüncül yapısında anormalliklere yol açmaktadır. Bu durum, hepatositlerdeki endoplazmik retikulumda protein sentezinin gecikmesine neden olmakta ve sentezlenen moleküller genellikle yüksek oranda polimerize olarak kümelenmektedir. Bu polimerler, endoplazmik retikulum içinde birikmeye başlamakta ve kan dolaşımına polimerize olmamış çok düşük miktarda molekül salınmaktadır. Alfa-1 antitripsin moleküllerinin sürekli birikimi hepatositlerde hücre hasarına ve sonrasında hücre ölümüne yol açabilmektedir [289].

Alfa-1 antitripsin, antiproteaz aktivitesinin ötesinde enflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde ve enflamasyonun baskılanmasında önemli bir işlev görmektedir. Molekülün antienflamatuvar etkileri bağışıklık tepkilerinin baskılanması, matris üretiminin ve doku onarımının teşvik edilmesi, antibakteriyel aktivitesi ile açıklanmaktadır [290].

ZZ genotipine sahip bireylerde yapılan araştırmalar, alfa-1 antitripsin moleküllerinin polimerizasyonunun hepatositlerin dışındaki periferik dokular gibi akciğer dokusunda da gerçekleştiğini göstermektedir. ZZ genotipine sahip hastalarda yapılan bronkoalveolar lavaj sıvı analizlerinde büyük miktarlarda polimerize alfa-1 antitripsin tespit edilmiştir. Bu polimerize moleküller işlevsel olarak inaktif görünmektedir ve söz konusu bireylerde akciğerin antiproteolitik kapasitesinin daha da azalmasına yol açmaktadır [291]. Bu proenflamatuvar etkilerin etkinliği ve önemi konusunda detaylı bilgi az olmakla birlikte alfa-1 antitripsin molekülünün monomerden polimere yapısal geçişi, antienflamatuvar bir molekülden proenflamatuvar bir moleküle dönüşümüne neden olabilir.

Şiddetli AAT eksikliği, bireylerin hem çocukluk hem de yetişkinlik dönemlerinde çeşitli karaciğer hastalıkları ve akciğer amfizemi gibi farklı hastalık türlerine yakalanma riskini

artırmaktadır. AAT'nin hatalı polimerizasyonu sonucunda hepatositlerde polimer ve inklüzyon cisimcikleri birikmekte ve bu durum hem çocuklarda hem de yetişkinlerde karaciğer hastalıklarının ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Ayrıca AAT'nin azalan serum ve doku konsantrasyonları akciğerleri ve diğer organları, elastaz ve diğer serbest proteazların neden olduğu proteolitik hasara karşı koruyacak yeterlilikte olmamaktadır. Alfa-1 antitripsin eksikliği, başlı başına bir hastalık olmayıp özellikle aynı bireyde diğer olumsuz çevresel faktörler veya etkileşim içinde olan diğer genlerle birlikte görüldüğünde yaşam boyu çeşitli hastalıkların gelişimine yatkınlık sağlayan kalıtsal bir durum olarak tanımlanmaktadır. Özellikle 30 yaşını geçmiş bireylerde KOAH, bebeklikten yetişkinliğe kadar olan süreçte ise karaciğer fonksiyon bozukluklarıyla kendini göstermektedir. AATD taşıyan bireyler ayrıca c-ANCA pozitif vaskülit ve pannikülit için de risk faktörü taşımaktadır. Alfa-1 antitripsin eksikliğinin enflamatuvar ve neoplastik hastalıklarla ilişkili olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır ancak bu ilişkiler henüz kesin olarak doğrulanmamıştır [278].

Alfa-1 antitripsin düzeyi, bireylerin genotipleri ile ilişkili olarak AATD'nin şiddetini belirlemektedir. Homozigot bireylerde özellikle PI*ZZ alelini taşıyanlarda, serum AAT seviyeleri düşük bulunmaktadır. Bu durum kronik obstrüktif akciğer hastalığı riskini artırmaktadır. Karaciğer hastalığı riski, patolojik intrahepatik inklüzyonlarla ilişkilendirilen alelleri taşıyan bireylerde örneğin Z, M malton, S iiyama alellerinde daha yüksek görülmektedir. Serum alfa-1 antitripsin eksikliği olan hastalarda klinik belirtilerin ortaya çıkması beklenmektedir. SZ veya ZZ genotipli hastaların büyük bir kısmında hem pulmoner hem de hepatik semptomlar gözlenirken SS genotipli bazı hastalarda da bu tür semptomlar mevcut olabilmektedir. MS veya MZ gibi normal ve varyant alelleri taşıyan heterozigot bireylerde klinik semptomlar nadiren gelişmektedir. Alfa-1 antitripsin eksikliği taşıyan hastalarda özellikle erken erişkinlik döneminde başlayan akciğer hastalığı baskın bir bulgu olarak ortaya çıkmaktadır. Semptomlar, tütün kullanımı ve mesleki toz maruziyeti gibi ek risk faktörleri varsa daha erken başlayabilir ve hızlı ilerleyebilir. Homozigot varyantları (ZZ ve SS) taşıyan hastalarda sigara içenlerde ortalama yaşam süresi 48 ila 52 yıl, içmeyenlerde ise 60 ila 68 yıl olarak tespit edilmiştir. AATD'nin yeterince tanınmaması genellikle ilk semptomların ortaya çıkmasından AATD'nin tanısı konulana kadar 5-7 yıl gibi uzun bir sürenin geçmesine neden olmaktadır. Hastalar teşhis konulmadan önce genellikle birden fazla doktor ziyaret etmektedir. Teşhisin gecikmesi ve ilk tanı anındaki klinik durumun kötüleşmesi arasında bir ilişki bulunmaktadır [292].

Alfa-1 antitripsin eksikliği (AATD), serum düzeyi normalin %35 veya daha altında olduğunda ciddi pulmoner bozukluklara neden olabilir. Bu durum genellikle panasiner akciğer amfizemi ve KOAH gelişimine yol açmakta, 30 ile 40 yaş arasında belirginleşen öksürük, nefes darlığı ve balgam gibi semptomlara neden olmaktadır. Ayrıca, AATD hastalarında bronş hiperaktivitesi ve ağır solunum yetmezliği gibi ilerleyici semptomlar görülebilmektedir. Sigara içimi, KOAH'ın ilerlemesini hızlandıran önemli bir faktör olup, sigara içmeyenler genellikle normal yaşam süresine sahip olabilmektedir [293]. Tanı sürecinde toraks muayenesi, akciğer fonksiyon testleri, BT ve radyografi gibi yöntemler önem arz etmektedir. Akciğer fonksiyon testleri, akciğer hacminde artış ve difüzyon kapasitesinde azalma gibi değişiklikleri ortaya koyabilir [294]. AATD ile ilişkili amfizem, özellikle çocuklarda nadir görülse de genetik faktörlerin birleşimi ile gelişebilmektedir [295]. Sigara içmeyen PI*MZ heterozigotları düşük risk altında olup, sigara içenlerde ise KOAH gelişimi riski artmaktadır. PI*SZ genotipli bireylerde ise sigara içimi, serum AAT düzeyi koruyucu eşik değerinin altında olduğunda akciğer hastalığı riskini artırmaktadır [296, 297].

Erken yaşlarda hiperbilirubinemi görülen çocuklarda siroza yol açan karaciğer yıkımı devam ederken bu durumun nedeni genellikle bilinmemektedir ve sadece az sayıda çocukta karaciğer hastalığı ilerlemektedir. PI*ZZ genotipi taşıyan bireylerde çocukluk çağı karaciğer hastalığı geliştirme riski genelde düşük seviyededir. PI*MZ ve PI*SZ genotiplerinde çocukluk çağı karaciğer hastalığı riski artışı beklenmemekle birlikte zaman zaman karaciğer enzimlerinde artış gözlemlenebilmektedir. İlk altı ayında karaciğer tutulumu belirtileri gösteren ve heterozigot genotipli 58 çocuğun katıldığı bir araştırmada çocukların neredeyse tamamında ilerleyen yaşlarda karaciğer enzim değerleri normal seviyelerde bulunmuştur [298].

Neonatal hepatit sendromunda, alfa-1 antitripsin eksikliği olan homozigot bireylerin küçük bir kesiminde kolestaz görülmekte ve bu hastalarda sarılık genellikle birkaç hafta içinde özel bir tedavi gerektirmeden iyileşmektedir. Yenidoğan dönemindeki bu klinik belirtiler ile yetişkinlikteki karaciğer hastalıkları arasında kesin bir bağlantı bulunmamaktadır [299]. İsveç'te yapılan bir araştırma, yenidoğanlarda yapılan AATD taramasında, PI*ZZ genotipine sahip hastaların %18'inde karaciğer anormallikleri ve %2.4'ünde karaciğer sirozu sonucu çocukluk döneminde ölüm görülmüştür [300, 301]. Yetişkinlerde karaciğer hastalığı yaygınlaşmakta, fibrozis ve siroz gelişmekte ve alfa-1 antitripsin eksikliği olan hastalarda

hepatosellüler karsinom riski artmaktadır [302, 303]. Bu hastalığın patofizyolojisinde, hepatositler içinde biriken polimerize alfa-1 antitripsin molekülleri önemli rol oynamaktadır. Alfa-1 antitripsin eksikliği, kronik karaciğer enflamasyonu ve hasarına ek olarak hepatosellüler karsinoma riskini artırmaktadır. Patoloji, endoplazmik retikulumda tutulan ve kan dolaşımına salgılanması gereken mutant Z proteininin hepatositlerde toksik fonksiyon kazanarak ER stresi yaratmasıyla ilişkilidir [304]. Ancak akciğer ve karaciğer hastalıklarının bir arada görülmesi nadirdir [305].

AAT, sıklıkla NE inhibitörü olarak tanımlanmasına rağmen proenflamatuvar NEU türevi katepsin G, proteinaz 3 ve alfa-defensinler gibi diğer proteinazların da inhibe edilmesinde rol almaktadır [286, 306, 307]. Araştırmalarda AAT'nin epitelyal sodyum kanallarını aktive eden bir hücre yüzeyi serin proteazı olan matriptaz, mast hücrelerinden türetilen kimaz ve triptaz ve lenfosit türevli granzim B'nin aktivitelerini de inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca pıhtılaşma ve sindirim enzimleri, serumdan ve dokudan türetilen kalkrein-7, ürokinaz ile ilişkili diğer serin proteazlar ve hücre içi sistein proteazı olan kaspaz-3 ile metalloproteinazlar da AAT tarafından inhibe edilmektedir [308, 309, 310].

AAT'nin antiproteinaz aktivitesinin yanı sıra anti-enflamatuvar ve immünomodülatör özelliklere de sahip olduğu belirlenmiştir [290, 280]. İn vitro çalışmalarda AAT'nin NEU süperoksit ve kemokin (IL-8) üretimini inhibe ederek makrofajdan türetilen interlökin-1 reseptör antagonistlerini aktive ettiği ve insan akciğer fibroblastlarında hepatosit büyüme faktörü üretimini teşvik ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda AAT'nin TNF-a ve bakteriyel endotoksin tarafından tetiklenen ölüme karşı koruyucu etkiler sağladığı, fare akciğer enflamasyon modelinde enflamasyonu ve bağ dokusu hasarını etkili bir şekilde bastırdığı in vivo şartlarında ortaya konmuştur [290, 311, 312]. Ayrıca AAT'nin hem transferrin reseptörü hem de ferritin sentezini artırarak demir metabolizmasında önemli bir rol oynadığı da araştırmalarla desteklenmektedir [308]. Farklı α 1-antitripsin fenotipleri ile ilişkilendirilen serum konsantrasyon aralıkları Çizelge 2.3'te sunulmuştur [313].

Çizelge 2.5. Çeşitli AAT fenotipleri ile ilişkili serum konsantrasyonları aralığı

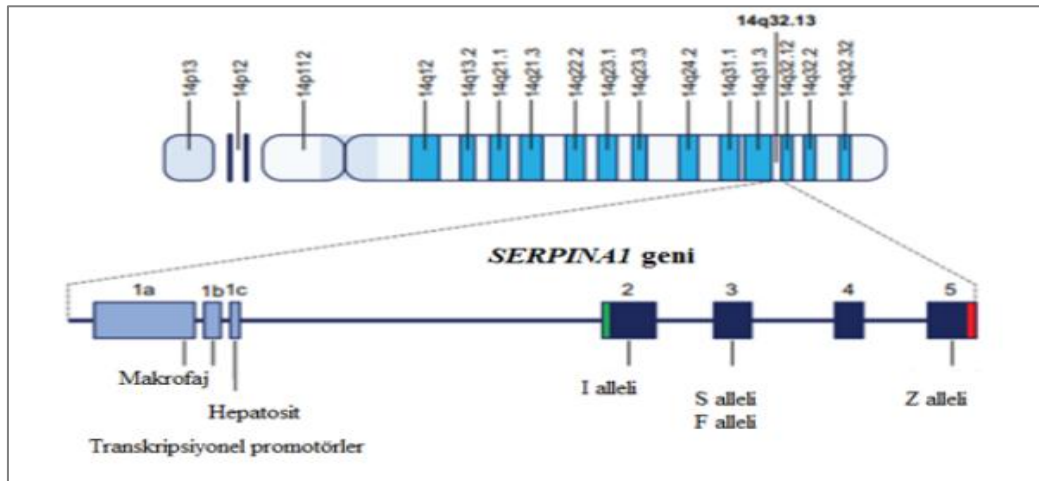
Fenotip	PiMM*	PiMZ	PiSS	PiSZ	PiZZ
Serum AAT seviyeleri $\mu\text{mol.L}^{-1}$ **	20 – 48	17 – 33	15 – 33	8 – 16	2,5 – 7
Serum AAT seviyeleri mg.dL^{-1} ***	150 – 350	90 – 120	100 – 200	75 – 120	20 – 45

* PiMM fenotipi ile ilişkili allellerin tüm kombinasyonları ** Saflaştırılmış standart kullanılarak ölçülen *** Tipik ticari standart kullanılarak ölçülen

2.3.2. Alfa-1 antitripsin geni

AAT, insan plazmasında yaygın olarak bulunan serin proteaz inhibitörleri ailesinin öncü bir üyesi olarak kabul edilmektedir. AAT, alfa1-proteinaz inhibitörü, alfa1-antiproteinaz, SERPINA1 ya da SERPIN clade A adlarıyla da bilinmektedir [277].

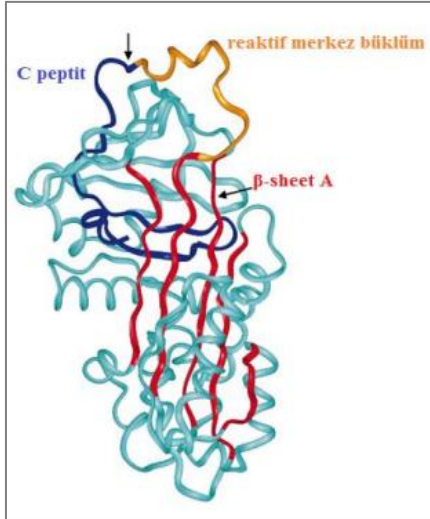
AAT, 14. kromozomun uzun kolunda yer almakta ve SERPINA1 geni tarafından kodlanmaktadır [314, 276]. SERPINA1 geni, 12.2 kb uzunluğunda olup yedi ekzondan oluşmaktadır. Bu ekzonların dördü kodlanmaktadır (2-5), üçü kodlanmamaktadır (1a-1c) ve altı intron bulunmaktadır [315, 316] (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. SERPINA1 geni yapısı [315, 316]

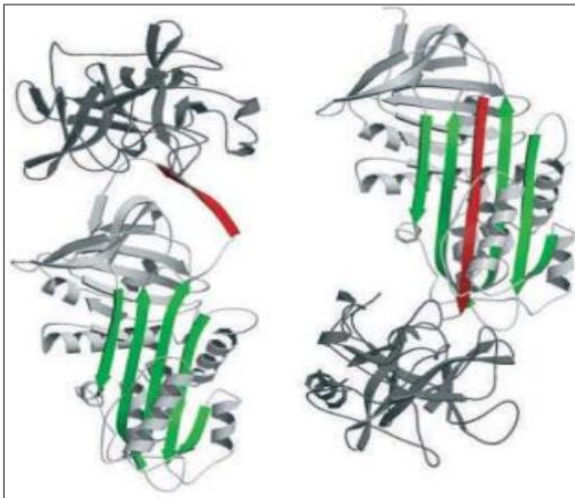
2.3.3. Alfa-1 antitripsin proteinin yapısı

Alfa-1 antitripsin, 394 amino asit içeren tek bir polipeptit zincirinden meydana gelmiş bir glikoprotein olarak tanımlanmaktadır. Bu molekülün toplam ağırlığı 52 kDa olup yapısı globüler bir formda bulunmaktadır [317, 318]. Alfa-1 antitripsinin X-ışını kristalografisi ile yapılan incelemeler sonucunda, üç β sheet tabakası, dokuz α heliks yapısı ve bir reaktif merkez bükümü (RCL) içerdiği belirlenmiştir. Hedef proteinazın inhibisyonunda psödosubstrat işlevi gören karboksi terminal yakınındaki reaktif merkez bükümü yaklaşık 20 amino asit uzunluğunda bir peptit parçasından oluşmakta ve moleküler yüzeyde dar bir alanda konumlanmaktadır [319, 320, 278] (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Alfa-1 antitripsin proteinin yapısı [278]

Reaktif merkez bükümde, AAT'nin ana hedefi olan NEU elastaza karşı yem rolü üstlenen metiyonin-serin amino asitleri bulunmaktadır. Hedef enzime bağlanmasını takiben AAT içerisindeki metiyonin-serin arasındaki yüksek enerjili bağ proteinaz tarafından kesilmekte ve bu olay β -sheet A'daki fazladan bir iplikçiğin reaktif büküme girmesiyle molekülde konformasyonel bir değişiklik yaratmaktadır. Bu yapısal değişim, AAT'nin NEU elastaza etkin bir şekilde yönelmesi ve proteinazın fare kapanı benzeri bir mekanizma ile inaktive edilmesi sürecini tetiklemektedir (Şekil 2.3). Konformasyonel olarak değişmiş olan AAT sonrasında hepatik reseptörler tarafından tanınmakta ve dolaşımdan uzaklaştırılmaktadır [321, 283].



Şekil 2.13. Alfa-1 antitripsin tarafından NEU elastazın inhibisyonu [283]

2.3.4. Alfa-1 antitripsin ve kardiyovasküler sistem

Arter duvarının yapısal dayanıklılığı, ekstrasellüler matrikste bulunan elastin ve kollajen gibi proteinler arasındaki dengenin korunması ile sağlanmaktadır. Elastik lamina içerisinde yer alan uzunlamasına fiber yapılar damarın uzunlamasına esnekliğini desteklemektedir. Bu lifler, rastgele sarmal şekillerde bulunan tropoelastin moleküllerinin polimerizasyonundan oluşan elastin çekirdekleri içermektedir. Tunika media tabakasında ise lifler, radial ve konsantrik düzenlerde yer alarak damarın enlemesine esnekliğini artırmaktadır. Mikrofilament yapılarından oluşan Fibrilin-1 ve Fibrilin-2, damar duvarında yaygın olarak bulunmakta ve esneklik sağlamaktadır. Damar duvarının diğer yapı taşları arasında Tip I ve III kollajenden oluşan kollajenaz ağları yer almaktadır. Matriks metalloproteinaz, elastaz gibi proteazlar ve bunların inhibitörleri olan TIMP, alfa-1 antitripsin, alfa-2 makroglobulin, büyüme faktörleri ve sitokinler tunika medyadaki düz kas hücrelerinin gelişimini düzenleyerek damar duvarı modellemesini ve yapım yıkım döngüsünü desteklemektedir. Fibroblastlar, adventisya tabakasında gerilim kuvvetini artırmaktadır [322]. Elastaz, kollajen ve elastini parçalayan proteolitik bir enzim olarak işlev görmektedir. Karaciğerden salınan AAT ise güçlü bir antiproteaz glikoprotein yapısında olup elastaz ile bağlanarak bu enzimi inaktive etmektedir [323]. AAT'nin eksikliği veya düşük seviyede bulunması elastik dokuda dengesizliklere yol açmaktadır. Yapılan araştırmalar AAT eksikliğinin intrakraniyal anevrizmalı hastalar arasında normal popülasyona göre daha sık rastlanıldığını göstermektedir [324].

Hollier ve ark.ları tarafından yapılan araştırmada aort duvarında üretilen ve bulunan yapısal proteinler elastin ve kollajenin kaybının anevrizma oluşumunun temel sebeplerinden biri olduğu belirlenmiştir. Bu kaybın, matriks proteazlarından elastaz ve kollajenazın aktivitelerinin artması veya anti-proteazlar olan TIMP ve AAT'nin aktivitelerindeki azalma ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [325].

Baker ve ark.ları hem rüptüre olmuş 41 hem de rüptüre olmamış 19 intrakraniyal anevrizmalı hastayı incelemişlerdir. Yapılan değerlendirmede rüptüre olmuş ve olmamış intrakraniyal anevrizmalı hastaların NEU elastaz, AAT oranının kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Intrakraniyal anevrizmalı hastalarda arter duvarında proteolizis oluşumuna yönelik hipoteze dayanarak yapılan bir çalışmada AAT genotipinin incelendiği ve anevrizma bulunanlar ile bulunmayanlar arasında belirgin bir fark olmadığı gözlemlenmiştir [326].

Delbosc ve ark.ları, abdominal aort anevrizması olan farelere elastaz inhibitörü olan AZD9668 molekülü uygulamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre AZD9668 molekülü alan farelerde anevrizma ilerlemesinde ve serum elastaz seviyesinde belirgin bir azalma gözlenmiştir [327].

Wilson ve ark.ları tarafından abdominal aort anevrizması olan 68 erkek hasta üzerinde yürütülen çalışmada, plazma elastin-AAT kompleks seviyesinin anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Araştırma, artmış elastin ve kollajen yıkımının aort duvarının esnekliğini azaltabileceğini ve bu durumun anevrizma oluşumuna katkı sağlayabileceğini ileri sürmektedir [328].

2.3.5. Alfa-1 antitripsin eksikliği

Alfa-1 antitripsin eksikliği tanısı serumda düşük alfa-1 antitripsin seviyesinin tespiti ve SERPINA1 geninde çift taraflı patojenik değişikliklerin belirlenmesi ile konmaktadır. Ayrıca proteaz inhibitörü tiplmesi kullanılarak fonksiyonel olarak yetersiz bir AAT protein varyantının saptanması, tanının kesinleştirilmesinde etkili olmaktadır [287].

Pi*ZZ genotipi, özellikle Avrupa'nın Atlantik Okyanusu'na kıyısı olan ve ada topluluklarına sahip bölgelerinde en yüksek prevalansı göstermekte, doğu yönünde ise bu oranlar kademeli olarak azalmakta ve Asya'da neredeyse hiç bulunmamaktadır. Baltık Cumhuriyetleri ile Danimarka ve İskandinav Yarımadası'nın güneyindeki bölgelerde en yüksek prevalans oranları (1:1500–1:2000 kişi) belirlenmiştir. Polonya, Ukrayna, Belarus, Almanya, Fransa, Hollanda, İber Yarımadası ve Britanya Adaları'nda prevalans oranları düşmekle birlikte yine de yüksek seviyelerde kalmaktadır. Avrupa'nın en dış bölgelerinde bu oran giderek azalmakta, Balkan Yarımadası ve Güney İtalya'da ise neredeyse hiç görülmemektedir. Pi*ZZ genotipi, Asya ve Afrika'nın çoğu bölgesinde ise hemen hemen yoktur. Pi*ZZ genotipine sahip bireyler tahminlere göre özellikle Orta ve Batı Avrupa'da yaşayan Kafkasyalılar olmak üzere AAT eksikliği ile ilişkili hastalıkların gelişimi açısından yüksek risk altında bulunmaktadır ve bu grup içerisinde en az 181.894 kişi olduğu öngörülmektedir. Avrupa'da Pi*SZ genotipi taşıyan 615.193 birey ve AAT eksikliğine bağlı hastalık geliştirme potansiyeli taşıyan diğer genotipler olan Pi*SZ, Pi*SS ve Pi*MZ genotiplerine sahip sırasıyla 1.269.054, 4.017.900 ve 42.564.136 birey bulunmaktadır [329]. İtalya'daki bir çalışma, Pi*Z ve Pi*S alellerinin prevalansında 20 bölgenin 18'inde önemli farklılıklar

olduğunu göstermektedir. Bu da herhangi bir ülkede bölgesel farklılıkların olabileceğine işaret etmektedir [330].

ABD’de yapılan bir çalışmada, beş ana etnik alt grup arasında Pi*S ve Pi*Z alellerinin prevalansı incelenmiş ve AAT eksikliği riskinin en yüksek Kafkasyalılarda, en düşük ise Siyahlar ve Hispanikler arasında olduğu, Asyalılar ve Meksikalı arasında ise bu riskin çok düşük olduğu tespit edilmiştir [330]. Alel frekanslarına dayanarak öngörülen hasta sayısının klinik olarak tanımlanan hasta sayısından çok daha düşük olduğu belirlenmektedir. Homozigot ZZ genotipi taşıyan bireylerin %10 ila %35’inin klinik semptom göstermediği tahmin edilmektedir [331]. Fenotip ve genotip arasındaki doğrudan bir bağlantının olmaması ve bunun nedenlerinin henüz anlaşılamamış olması önemli bir bulgudur.

Alfa-1 antitripsin eksikliği patofizyolojisi

Alfa-1 antitripsinin en önemli substratı olan NEU elastaza karşı ZZ genotipi taşıyan bireylerde antiproteolitik aktivite normalden yaklaşık 5 kat daha azdır [332]. Alfa-1 antitripsin eksikliği bulunan hastalarda karaciğer fibrozu ve siroz riski oldukça yüksektir. Sirozun ilerleme evresi ile birikmiş polimerize moleküllerin miktarının ilişkili olduğu belirtilmektedir [304]. Alfa-1 antitripsin eksikliği ile ilişkili bir başka patolojik durum olarak akciğerde proteazlar ve antiproteazlar arasındaki dengenin bozulması sonucu çoğu proteaz inaktive edilememekte ve bu durum yavaş yavaş alveolar yapılar, akciğer matriksi ve kan damarlarına zarar vermektedir. Bu süreç kronik obstrüktif bronşit ve akciğer amfizemi gibi ilerleyici yıkımlara yol açmaktadır [333].

Nadir diğer organ bulguları

Alfa-1 antitripsin eksikliği, ender görülen nekrotizan pannikülit [334], antiproteinaz-3 ile ilişkili vaskülit [335] ve abdominal aort ile beyin arterlerinin anevrizmaları gibi durumlarla ilişkilendirilmiştir. Pannikülit, özellikle travma sonrası bölgelerde ülser neden olan göçer, enflamatuvar ve hassas cilt nodülleri şeklinde belirginleşmektedir. Derideki pannikülit, akciğerlerdeki amfizem benzeri PI*Z alelinin ürettiği proteinin proteolitik hasara direnç gösterememesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Pannikülit, AAT eksikliği ile bağlantılı bir cilt rahatsızlığıdır ancak bu durum AAT eksikliği olan 1000 hastadan yaklaşık birinde meydana gelmektedir. Vaskülit, AAT eksikliği ile ilişkili nadir rastlanan bir başka hastalıktır.

Yapılan vaka serileri, antiproteinaz 3 antikorları pozitif olan hastalarda anormal AAT fenotiplerinin aşırı temsil edildiğini göstermiş ve iki durum arasında bir ilişki kurulmuştur. Özellikle c-ANCA pozitif bireylerde Z alelinin prevalansı %5,6-17,6 arasında bulunmuştur ve bu oran sağlıklı bireylerdeki prevalansa göre üç ila dokuz kat daha yüksektir [313].

Aktürk'ün yapmış olduğu çalışmada, 18 yaş altı çocuklarda Alfa-1 antitripsin eksikliği tanısı ile ilişkili demografik, klinik, laboratuvar, histopatolojik bulgular ve genotipler retrospektif olarak değerlendirilmiştir. İki ana grup incelenmiştir. Homozigot ZZ alleleline sahip olanlar ve diğer genotiplere sahip olanlar. AAT düzeyi, homozigot ZZ grup 1'de, diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Çalışma süresince son dönem karaciğer hastalığı nedeniyle iki hastaya karaciğer nakli yapılmıştır. Bu çalışma, Alfa-1 antitripsin eksikliğinin çocuklarda karaciğer hastalığına yol açtığını ancak taşıyıcıların sadece küçük bir kısmında ilerleyici karaciğer hastalığı geliştiğini göstermiştir. Genel olarak homozigot ZZ alleli taşıyan hastalar daha şiddetli karaciğer tutulumu riski altındadır, ancak bu durum her zaman klinik olarak belirgin karaciğer hastalığına yol açmayabilir [336].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan, Kit Kimyasal ve Gereçler

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Sarflar

Çalışma süresince kullanılan kitler Çizelge 3.1 ile belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Nötrofil izolasyonunda kullanılan kitler

Kimyasal, Kit ve Sarf Malzeme Listesi	Katalog No	Firma
Polipropilen Falkon Tüpü (15 ml)	601052	NEST (ÇİN)
Polipropilen Falkon Tüpü (50 ml)	078.02.003	ISOLAB (ALMANYA)
Steril Filtreli Pipet Ucu (10 µL)	TF-R-S-10	ISOLAB (ALMANYA)
Steril Filtreli Pipet Ucu (100 µL)	TF-R-S-100	ISOLAB (ALMANYA)
Steril Filtreli Pipet Ucu (200 µL)	TF-R-S-200	ISOLAB (ALMANYA)
Steril Filtreli Pipet Ucu (1000 µL)	TF-R-S-1000	ISOLAB (ALMANYA)
Serolojik Pipet (1000 µL)	084.05.001	ISOLAB (ALMANYA)
Pastör Pipeti	612361	GREINER (ALMANYA)
Sodyum Heparinli Tüp (9 mL)	455084	VACUETTE (AVUSTURYA)
Düz tabanlı 96 Kuyucuklu Hücre Kültürü Plağı	LB.IS.122.11.096	ISOLAB (ALMANYA)
Kriyo Tüp (2 mL)	121277	GREINER (ALMANYA)
Dulbecco's PBS(1X)	PBS-1A	CAPRICORN SCIENTIFIC (ALMANYA)
RPMI 1640 (w/L-Glutamine)	SLR-563-500	SEROX (ALMANYA)
Lymphocytes Separation Media Density (1.077 g/mL)	LSM-B	CAPRICORN SCIENTIFIC (ALMANYA)
Sodyum Klorür	7647-14-5	MERCK (ALMANYA)
Dextran	D4751	SIGMA ALDRICH (ALMANYA)
Tripan Mavisi	15250061	GIBCO (AMERİKA BİRLEŞİK DEVLETLERİ)
NETosis Assay Kit	601010	CAYMAN CHEMICAL COMPANY (İNGİLTERE)
PMA (1mM) Assay Reagent	40145	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
S7 Nuclease Assay Reagent	601011	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
EDTA (500 nM) Assay Reagent	601012	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
NET Assay Neutrophil Elastase Substrate	601013	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
Human Neutrophil Elastase Assay Reagent	601014	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
A23187 (25 mM) Assay Reagent	400085	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
Bovine Serum Albumin Assay Reagent	400086	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
Calcium Chloride (1mM) Assay Reagent	4000087	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
96-Well Solid Plate (Colorimetric Assay)	400014	CAYMAN CHEMICAL COMPANY
96-Well Cover Sheet	400012	CAYMAN CHEMICAL COMPANY

3.1.2. Çalışmadada Kullanılan Gereçler

Çizelge 3.2. Kullanılan Araç-Gereçler * Hematoloji laboratuvarının desteği ile kullanılmıştır

CİHAZ ADI	MODEL	MARKASI
*Hematoloji Analiz Cihazı	DxH 900	BECKMAN COULTER (AMERİKA BİRLEŞİK DEVLETLERİ)
Mikroplak Santrifüj Cihazı	DIGICEN 21 R	ORTOALRESA (İSPANYA)
Santrifüj Cihazı	NF 3000R	NUVE (TÜRKİYE)
Combi-Spin Cihazı	FVL-2400N	BIOSAN (LETONYA)
Hassas Terazı	Pioneer PA	OHAUS (İSVİÇRE)
ELISA Okuyucu	ELX800	BioTek INSTRUMENTS (AMERİKA BİRLEŞİK DEVLETLERİ)
Distile Su Cihazı	16000 DP	RENTRO (TÜRKİYE)
Derin Dondurucu (-20°C)	2556A++D	ARÇELİK (TÜRKİYE)
Buzdolabı (+4°C)	SDS171(TK)/HA	HOTPOINT ARİSTON (İTALYA)
İnkübatör (37±0,5 °C)	DH4000BII	FAITHFUL INSTRUMENT

3.2. Çalışma Gruplarının Demografik ve Klinik Özellikleri

Bu çalışmaya Gazi Üniversitesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nda poliklinik şartlarında ayaktan izlenen, sadece ateş atağı olan 8 kişi, sadece peritoniti olan 1 kişi, peritoniti, plöriti ve ateşi olan 4 kişi, peritoniti, artriti ve ateşi olan 3 kişi, artriti ve ateşi olan 13 kişi, plöriti ve ateşi olan 10 kişi, peritoniti ve ateşi olan 18 kişi, peritoniti ve artriti olan 1 kişi, peritoniti ve plöriti olan 2 kişi, remisyonda olan 15 kişi ve sağlam-sağlıklı olan 17 kişi dahil edilmiştir. Çalışma kapsamında bu çocuklardan alınan periferik venöz kan örnekleri ile bu kan örneklerinden izole edilen serum örneklerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubunda yer alan 17 sağlıklı çocuğun herhangi bir hastalığı bulunmamaktadır. Bu araştırmada yer alan analizler, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji ve Biyokimya Ana Bilim Dallarının laboratuvarı imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince toplam 92 çocuk araştırmaya dahil edilmiştir. AAA tanısı konulmuş hasta ve kontrol grubunda bulunan sağlıklı çocuklar ile ebeveynlerine çalışma ile ilgili gerekli bilgiler detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Çocukların kendisinden ve çocuğunun çalışmaya katılmasını kabul eden ebeveynlerden araştırma öncesinde yazılı onamlar alınmıştır. Hem hasta grupları hem de kontrol grubundaki katılımcıların cinsiyet, yaş, hastalık durumu, kullanılan ilaç bilgisi, atak özellikleri, NEU, WBC, AAA mutasyonu, AAT ve NETozis sonucu olgu rapor formuna kaydedilmiştir.

AAA tanısı konmuş hastalar ateş, plörit, peritonit, artrit birliktelikleri ve remisyon durumuna göre gruplara ayrılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Çalışmaya dahil edilen hastaların gruplandırılması

Grup	Hastalık Durumu	Sayı
1	Sadece Ateş	8
2	Sadece Peritonit	1
3	Peritonit + Plörit + Ateş	4
4	Peritonit + Artrit + Ateş	3
5	Artrit + Ateş	13
6	Plörit + Ateş	10
7	Peritonit + Ateş	18
8	Peritonit + Artrit	1
9	Peritonit + Plörit	2
10	Remisyon	15
11	Sağlıklı (Kontrol)	17

Etik kurul onayı, Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 16.05.2022 tarihli 363 sayılı kararı ile alınmıştır.

3.3. Katılımcıların Araştırmaya Dahil Olma ve Dışlanma Kriterleri

Araştırmaya dahil olma kriterleri;

- 3-18 yaş arasında olması
- Daha önceden tanı konulmuş ve izlenmekte olan AAA hastaları ve sağlıklı gönüllüler
- NET formasyonunu inhibe eden ilaçların kullanılmaması (Rapamisin, Lapatinimib, vb) [338].

Araştırmadan dışlama kriterleri;

- Kontrol grubunda hastalık olması
- Hasta gruplarında başka bir otoimmün hastalık olması
- NEU izolasyonu aşamasında NEU saflığının %80'in altında olması veya izole edilen NEU sayısının 1.000.000/ml'den az olması
- Hastalarda immün yetmezlik, ya da enfeksiyöz bir hastalık durumunun olması
- Hastalarda herhangi bir malign hastalık bulunması
- Rapamisin ve Lapatinimib gibi NET formasyonu inhibe eden ilaçlar kullanılması

3.4. Laboratuvar Örneklerinin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

NETozis testi için alınan kan örneklerinden aşağıda Bölüm 3.4 anlatıldığı şekilde nötrofil izolasyonu yapıldı ve ticari olarak mevcut olan NETOzis kiti (NETosis Assay, Cayman Chemical Company –İngiltere) ile çalışılmaya başlandı, ancak eldeki test miktarını ekonomik kullanabilmek amacı ile Bölüm 3.5.1’de belirtildiği şekilde çalışma gününe kadar -20 °C derecede saklandı.

Gazi Üniversitesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı polikliniklerinde görülen, Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) tanısı almış; atak ile geldiğinde sadece ateşi olan 8, sadece peritoniti olan 1, peritonit, plörit ve ateşi olan 4, peritonit, artrit ve ateşi olan 3, artrit ve ateşi olan 13, plörit ve ateşi olan 10, peritonit ve ateşi olan 18, peritonit ve artriti olan 1, peritonit ve plöriti olan 2 çocuk ve remisyonda olan 15 AAA tanılı çocuk ile sağlam-sağlıklı 17 çocuk (Çizelge 3.2.) ile ebeveynleri gönüllü olarak araştırmaya katılmaya karar verip gönüllü onam formları imzalandıktan sonra; her çocuktan NETozis çalışması için heparin içeren kan alma tüpüne 5-8 ml periferik venöz kan örneği alındı.

Çalışma üç basamakta yürütülmüştür:

- (i) Birinci basamakta, NET formasyonunu belirlemek için, dahil edilen çalışma grubu ve kontrol grubundaki her çocuktan heparinli tüpe 5-8 ml periferik venöz kan alınmıştır. Bu periferik venöz kandan Histopaque kullanarak dansite gradyan yöntemi ile aşağıda anlatıldığı şekilde (Bölüm 3.4.) nötrofiller izole edilmiş ve NETOzis ölçüm kiti ile üretici firma talimatları doğrultusunda çalışma devam edilmiştir.
- (ii) İkinci basamakta, atak tiplerini sınıflandırdığımız çocukların rutin muayeneleri sırasında istenen serum AAT düzeyleri hasta dosyalarından rutin biyokimya sonuçlarından araştırılmış ve bulunan sonuçlar biyokimya laboratuvarı sorumlusu ile birlikte incelenerek not edilmiştir.
- (iii) Bu bağlamda çalışmanın üçüncü basamağında tanı alırken gen mutasyonları tespit edilmiş olan çocuklarda MEFV gen mutasyonlarının NET formasyonu oluşumunda ve AAT düzeyinde herhangi bir fark yaratıp-yaratmadığını tespit etmek için sınıflandırdığımız ataklar ve remisyonda olan hastalarda karşılaştırma yapılmıştır.

Deneyisel çalışmalar, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı Rutin İmmünoloji Laboratuvarı'nın araç-gereç olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5. Alınan Kan Örneklerinden Nötrofil (NEU) İzolasyonu

Periferik venöz kandan nötrofiller (NEU) dekstran sedimantasyonu ve dansite gradienti separasyon yöntemiyle izole edilmiştir [338, 339].

3.5.1. Nötrofil izolasyonunun temel ilkeleri

Heparin içeren kan alma tüpüne periferik venöz kan örneği alındığı andan itibaren, polimorfonükleer lökositler 24-48 saat kadar canlı kalabilmektedir. Polimorfonükleer lökositlerin kültürdeki ömrü göz önünde bulundurulduğunda, kandan izole edilmesi ve zaman kaybetmeden deneylere başlanması oldukça önemlidir. Periferik kan polimorfonükleer lökositlerinin izolasyonu, dekstran destekli rozet oluşumu ile hipotonik lizis kullanılarak kırmızı kan hücrelerinin temizlenmesi süreçlerini içermektedir. Dansite gradyan separasyonu yöntemi ile Ficoll kullanılarak polimorfonükleer lökositler periferik kan mononükleer hücrelerinden ayrılır ve %85'in üzerinde bir saflıkta nötrofiller kandan izole edilir. Dekstran viskozitesinin artırılması ve matriks oluşturma sayesinde, kana karışan hücrelerin etrafında bir matriks oluşturur ve bu matriks içindeki hücreler çöker. Böylece istenmeyen hücreler kandan ayrılarak izole edilebilir [324, 325].

Araştırmamızda NEU'leri ayırmak için çalışma her 5 ml periferik venöz kan 1 ml %10'luk dekstran ile muamele edildi: 1ml %10'luk dekstran 5 ml periferik venöz kan ile bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve nötrofiller %90 saflıkta izole edildi. Nötrofil saflık oranları Gazi Üniversitesi Hastanesi Rutin Hematoloji Laboratuvarı'nın destekleri ile hematometre cihazı ile yapılan tam kan sayımı (CBC) çalışması ile belirlendi.

3.5.2. Nötrofillerin izolasyonu süreci

1. adım: Heparin içeren kan alma tüpüne 5-8 ml periferik venöz kan alındıktan sonra tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve ardından 15 ml'lik polipropilen tüpe aktarıldı. Tüpe aktarılan periferik venöz kan üzerine 1ml %10'luk dekstran eklenerek tüp tekrar alt üst edilerek karıştırıldı.

2. adım: Dekstran ilave edildikten sonra tüp oda sıcaklığında ve hareket ettirilmeden 1 saat boyunca inkübasyona bırakılarak faz ayrımı sağlandı. Böylece, sedimentasyon yoluyla lökositler eritrositlerden ayrıldı.

3. adım: Faz ayrımı sağlandıktan sonra pastör pipeti ile üstteki faz çekilerek alındı ve yeni bir tüpe konulan oda sıcaklığındaki 2,5 ml Ficoll solüsyonu üzerine iki faz olacak şekilde aktarıldı.

4. adım: Mononükleer hücrelerden nötrofilleri ayırmak için, tüp +4°C sıcaklıkta 20 dakika 516xg'de santrifüj edildi.

5. adım: Santrifügasyondan sonra süpernatant tamamen atılarak, kırmızı kan hücrelerini lizise uğratmak için, tüpe 0,5 ml PBS ve 2,5 ml distile sudan oluşan 3 ml solüsyon eklendi. Tüpün dibine çökmüş olan hücre pelleti, köpük portüp üzerinde sürüklenerek dağıtıldı. Ardından karışım 45 saniye boyunca alt üst edilerek homojen görünüme ulaşana kadar karıştırıldı.

6. adım: Elde edilen karışımın üzerine 2 ml %3 lük NaCl solüsyonu eklendi ve tekrar alt üst edilerek karışması sağlandı.

7. adım: Üzerine %3'lük NaCl solüsyonu eklenen karışım +4°C sıcaklıkta ve 290xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.

8. adım: Santrifüjden sonra süpernatantın tamamen atıldı. Dipte çöken hücre pelleti üzerine 500 µl NET çalışma tampon çözeltisi (*assay buffer*) eklenerek, çökmüş hücre pelleti köpük portüp üzerinde sürüklenerek dağıtıldı. Karışım homojen görünüme ulaşınca kadar karıştırıldı.

9. adım: Son olarak nötrofil miktarının belirlenmesi için Hematoloji Rutin Laboratuvarının desteği ile Beckman Coulter hematometre cihazında ile tam kan sayımı (CBC) testi yapıldı.

3.5.3. İzole edilen nötrofillerin canlılık oranlarının belirlenmesi

İzole edilen NEU'lerin canlılık durumlarının tespit edilmesi amacıyla tripan mavisi dışlama yöntemi kullanıldı: Hücreler tripan mavisi boyası ile karıştırılarak inkübe edildiğinde canlı hücreler boyaya geçirgen olmadığı için berrak, yuvarlak olarak izlenirken; ölü hücreler

tripan mavisi boyasını içlerine alırlar [339]. Besiyeri ortamında homojen süspansiyon halinde bulunan nötrofiller ile %0,04'lük tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılarak 1-2 dakika boyunca inkübe edildi. Neubauer lamına boyanmış hücre süspansiyonundan 10µl koyularak ışık mikroskobunda 40x büyütme ile incelendi [340]. Toplam 5 büyük karede bulunan hücreler, mavi renkte görünenler “ölü” ve renksiz görünenler ise “canlı” kabul edilerek sayıldı. Böylece beş büyük karede bulunan hücrelerin toplamı ve canlı hücrelerin ortalaması alınarak, nötrofillerin %95'inin canlı olduğu saptandı. Canlılık oranı şu formül ile hesaplandı:

$$\text{Canlılık oranı} = (\text{Toplam canlı hücre sayısı} / \text{Hücre sayısı}) \times 100$$

3.6. Nötrofillerde NET Formasyonunun Ölçümü

3.6.1. NET formasyonunun ölçümünde temel ilke

NET formasyonu (NETozis); ticari olarak mevcut olan bir NETozis test kiti kullanılarak çalışıldı (*NETosis Assay Kit*, Item No. 601010 Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, Amerika Birleşik Devletleri) ve 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Bu kit DNA'ya bağlı bir test değildir. Bunun nedeni ise DNA salınımının NETozis'ten bağımsız olarak gerçekleşebilmesidir. NETozis test kitinin çalışma prensibi doğrultusunda izole edilen nötrofiller PMA ve LPS gibi çeşitli uyarıcılarla uyarılarak NETozis indüklenir. Dört saat süren inkübasyonun ardından NET oluşumu sonunda ortamda çözünebilir nötrofil elastaz (NE) ve nötrofil ekstraselüler tuzaklarına (NET'lere) bağlı NE bulunur. Çözünür NE ve NET'lere bağlanmamış NE ise yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. NET'leri degrade eden S7 nükleaz, DNA'ya bağlı proteinlerin serbest kalmasına neden olur. NE tarafından seçici olarak bölünen bir substrat besi ortamına eklenir. Nötrofil elastaz substratı parçaladıktan sonra, 405 nm'de ışığı emen 4-nitroanilin ürünü ortaya çıkar. Spektrofotometre aracılığıyla 405 nm dalga boyunda ölçüm yapılır ve NE aktivitesi belirlenir. Elde edilen verilerin analizi sonucunda NETozis derecesi ve yoğunluğu değerlendirilir [341].

3.6.2. NETozis formasyonu ölçümü sırasında hazırlanan çözeltiler ile bu çözeltilerin hazırlanma biçimleri

1. adım: NET test tampon solüsyonunun (*assay buffer*) hazırlanması için 20 ml RPMI ile 20µl (1M) Kalsiyum Klorür karıştırıldı. Bu karışımın içerisine 0,2 g donmuş Sığır Serum Albümini (BSA: *Bovine Serum Albumin*) eklenerek çözülmesi sağlandı. Çözelti taze olarak kullanıldı.
2. adım: PMA (1mM) Test Reaktifi hazırlamak için 2 µM ara stok solüsyonu oluşturuldu. Bunun için 1µl PMA (1mM), 0,5 ml NET test tampona eklendi. Ardından bu ara stok solüsyonundan 4µl önceden ısıtılmış 1 ml NET test tampon solüsyonuna eklendi ve 1 nM PMA hazırlandı. Bu çözelti taze olarak kullanıldı.
3. adım: S7 Nükleaz Test Reaktifinin hazırlanması için 37,5 U/ml'lik bir solüsyon hazırlandı. Bu solüsyon için 2,5µl S7 Nükleaz (15.000 U/ml'de) 1ml önceden ısıtılmış NET test tampon solüsyonu ile seyreltilti. Çözelti taze olarak kullanıldı.
4. adım: NE Substratının hazırlanması ve numunelerin tahlil edilmesi için, 500 µl NE Substratı 14,5 ml PBS ile seyreltilti (1:30 seyreltme). Bu çözelti taze olarak kullanıldı.

3.6.3. NET formasyon ölçümü

1. adım: NEU'ler 1×10^3 hücre/µl = 1×10^6 hücre/ml yoğunluğunda olacak biçimde, NET test tampon solüsyonu aracılığıyla resüspanse edilerek NEU hücre süspansiyonu hazırlandı. Çalışmada 96 kuyucuklu, düz tabanlı mikropak kullanıldı. Her bir örnek için 2'şer kuyucuğa 100µl/kuyucuk NEU hücre süspansiyonu eklendi. Bu kuyucuklardan birinde nötrofil uyarımı yapılırken, diğerinde uyarım yapılmadı. Nötrofil uyarımı yapılmak istenen kuyucuğa 50 µl PMA (1nM) ve uyarım yapılmak istenmeyen kuyucuğa 50 µl NET test tampon solüsyonu eklendi. Mikroplağın üzeri kapatıldı ve 4 saat boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edildi.
2. adım: Uyarım sağlandıktan ve NET formasyonu tamamlandıktan sonra, süpernatantlar kuyucuklardan yavaşça aspire edildi. Önceden oda ısısında bekletilerek ısıtılmış NET deney tampon solüsyonu ile (100 µl/kuyucuk) mikropak 2 kez yavaşça yıkandı. Ardından NET ile bağlanmamış olan çözünür nötrofil elastaz ortamdan pipetle aspire edilerek uzaklaştırıldı.

3. adım: Kuyucukların her birine 200µl seyreltilmiş S7 Nükleaz eklendi. Mikroplak 37°C’de 45 dakika boyunca inkübe edilerek S7 Nükleazın NET’leri degrade edip nötrofil elastazın DNA’dan ayrılması sağlandı.

4. adım: Her bir kuyucuğa 2µl EDTA (500 mM) eklenerek Nükleazın etkisiz hale getirilmesi sağlandı. Mikroplakların 5 dakika boyunca 300xg hızında santrifüj edilmesiyle hücresel kalıntılarının çökmesi sağlandı.

5. adım: Süpernatantlar ayrı bir doku kültürü plağına aktarıldı. Nötrofil elastaz ölçümünde kullanılıncaya kadar mikroplağın üzeri kapatılarak -20°C’de derin dondurucuda saklandı.

6. adım: Seyreltici hazırlamak için 20 ml NET test tampon solüsyonuna 400 µl EDTA eklendi. İnsan Nötrofil Elastaz Test Reaktifini (18 U/ml) kullanarak standart bir eğri çalıştırmak için sekiz adet 15 ml’lik falkon tüpü alındı ve #1'den #8'e kadar etiketlendi. 1 numaralı tüpe 5ml önceden ısıtılmış seyreltici ve 2-8 numaralı tüplere 1 ml eklendi. 10 µl insan Nötrofil Elastaz tüp #1'e aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Bu standartın konsantrasyonu 36 mU/ml'dir. Bir numaralı tüpten 1 ml alındı ve 2 numaralı tüpe aktarıldı. 7 numaralı tüpe kadar seri dilüsyon yapıldı. 8 numaralı tüpe ise herhangi bir standart ilave edilmedi. Standartlar ile örnekler 37°C sıcaklığa kadar ısıtıldı.

7. adım: Her bir kuyucuğa 100 µl örnek, standart ve 100µl Substrat eklendi. Ardından mikroplağın üstü kapatılıp 2 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda mikroplak 405 nm dalga boyundaki filtre ve otomatik ELISA okuyucu ile ölçüldü ve her bir kuyucuğun optik dansiteleri kaydedildi. Bilgisayar ortamında dikey eksende bulunan her bir standart için elde edilen optik dansite, yatay eksene yerleştirildi ve standart bir eğri oluşturuldu. Bu eğri bağlamında örneklerle yönelik verilerin hesaplaması yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve tabloların oluşturulması amacıyla SPSS (SPSS Inc., Chicago IL, USA) version 22 kullanılmıştır. Ölçümle elde edilen sürekli değişkenlerin (nicel değişkenler) sunumu için ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum, kategorik değişkenlerin (nitel değişkenler) sunumu için ise frekans ve yüzde kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde Chi-Square (X²) testi

kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Nicel değişkenler bakımından iki grubun karşılaştırılması amacıyla parametrik test koşullarının sağlandığı değişkenler için “Student’s t testi”, parametrik test koşullarının sağlanmadığı durumlarda ise “Mann-Whitney U testi” kullanılmıştır. Üç ve daha fazla grubun karşılaştırılmasında ise normal dağılan değişkenler için “One-way ANOVA (Bağımsız gruplar tek yönlü varyans analizi)” ile birlikte “Tukey çoklu karşılaştırma testi”, normal dağılmayan değişkenler için ise “Kruskal Wallis H testi” ile birlikte “Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi” uygulanmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiler ise Spearman korelasyon analizi ile incelenmiştir. Bütün istatistiksel analizlerde önemlilik seviyesi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışma süresince toplam 118 kişi çalışmaya alındı ancak kandan NEU izolasyonu aşamasında izole edilen nötrofil sayısının 1.000.000/ml'den daha az olması veya nötrofil saflığının %80'in altında olması nedeniyle 26 hasta çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya atak sırasında sadece ateşi olan 8; sadece peritoniti olan 1; peritonit, plörit ve ateşi olan 4; peritonit, artrit ve ateşi olan 3; artrit, ve ateşi olan 13; plörit ve ateşi olan 10; peritonit ve ateşi olan 18; peritonit ve artriti olan 1; peritonit ve plöriti olan 2; remisyonda olan 15 AAA hastası çocuk ve sağlam-sağlıklı 17 çocuk olmak üzere toplamda 92 çocuk dahil edilerek verileri analiz edildi.

Çalışmaya dahil edilen guplardaki çocukların yaş ortalamaları Çizelge 4.1'de, farklı atak gruplarında yaş ortalamaları ise çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamındaki çocukların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grupları	Atak (n: 60; %65,2)		Remisyon (n: 15; %16,3)		Kontrol (n: 17; 18,5)		Toplam (n: 92)	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
3 – 8 yaş	17	(28,3)	3	(20,0)	4	(23,5)	24	(26,1)
8,01 – 11 yaş	15	(25,0)	2	(13,3)	5	(29,4)	22	(23,9)
11,01 – 14 yaş	16	(26,7)	7	(46,7)	5	(29,4)	28	(30,4)
14,01 – 18 yaş	12	(20,0)	3	(20,0)	3	(17,6)	18	(19,6)
Yaş (ortalama±SS)	11,2 ± 4,0		11,3 ± 4,3		11,1 ± 4,1		p=0,992	

Yaş ortalamaları bakımından çalışmaya alınan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Buna göre çalışma kapsamındaki atak, remisyon ve kontrol grubundaki çocukların yaşlarının benzer olduğu söylenilebilir.

Çizelge 4.2. Çalışma kapsamındaki AAA hastası farklı atak gruplarındaki çocukların yaşa göre dağılımı

Ataklar	Yaş grupları								Tüm yaş gruplarında ataktaki hasta	
	3 – 8 yaş		8,01 – 11 yaş		11,01 – 14 yaş		14,01 – 18 yaş			
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Ateş	2	(11,8)	2	(13,3)	2	(12,5)	2	(16,7)	8	(13,3)
Peritonit							1	(8,3)	1	(1,7)
Artrit + Ateş	5	(29,4)	4	(26,7)	2	(12,5)	2	(16,7)	13	(21,7)
Plörüt + Ateş	2	(11,8)	3	(20,0)	4	(25,0)	1	(8,3)	10	(16,7)
Peritonit + Ateş	4	(23,5)	6	(40,0)	5	(31,3)	3	(25,0)	18	(30,0)
Peritonit + Artrit							1	(8,3)	1	(1,7)
Peritonit + Plörüt							2	(16,7)	2	(3,3)
Peritonit + Plörüt + Ateş	2	(11,8)			2	(12,5)			4	(6,7)
Peritonit + Artrit + Ateş	2	(11,8)			1	(6,3)			3	(5,0)
Toplam sayı (n)	17		15		16		12		60	

AAA hastası farklı atak gruplarındaki çocukların yaş dağılımı incelendiğinde en fazla hasta sayısı 3-8 yaş grubunda (n:17) olup, bunun içinde de en çok hasta sayısı Artrit +Ateş atak grubunda (n:5) görüldü. Tüm yaş gruplarındaki hastalar içinde ise en çok hasta içeren atak grubu Peritonit+Ateş atak grubuydu (n:18, %30). Yine tek tek yaş gruplarında en yüksek hasta sayılı atak grubu da 8,01-11 yaş grubundaki Peritonit+Ateş atak grubuydu (n:6).

Çizelge 4.3’de, çalışma gruplarındaki ve Çizelge 4.4’de farklı atak gruplarındaki çocukların cinsiyetlerine göre dağılımları verilmiştir.

Çizelge 4.3. Çalışma kapsamındaki çocukların cinsiyet gruplarına göre dağılımı

Gruplar	Erkek (47, %51,1)		Kız (45, %48,9)		Toplam (n: 92)		Ki-kare değeri	p-değeri
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)		
Atak	33	(70,2)	27	(60,0)	60	(65,2)	2,283	0,319
Remisyon	5	(10,6)	10	(22,2)	15	(16,3)		
Kontrol	9	(19,1)	8	(17,8)	17	(18,5)		

Gruplar arasında cinsiyet dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.4. Çalışma kapsamındaki AAA hastası farklı atak gruplarındaki çocukların cinsiyete göre dağılımı

Ataklar	Erkek (n: 33, %55)		Kız (n: 27, %45)		Toplam (n: 60)	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Ateş	3	(9,1)	5	(18,5)	8	(13,3)
Peritonit	-	-	1	(3,7)	1	(1,7)
Artrit + Ateş	9	(27,3)	4	(14,8)	13	(21,7)
Plorit + Ateş	6	(18,2)	4	(14,8)	10	(16,7)
Peritonit + Ateş	10	(30,3)	8	(29,6)	18	(30,0)
Peritonit + Artrit	-	-	1	(3,7)	1	(1,7)
Peritonit + Plorit	-	-	2	(7,4)	2	(3,3)
Peritonit + Plorit + Ateş	4	(12,1)	-	-	4	(6,7)
Peritonit + Artrit + Ateş	1	(3,0)	2	(7,4)	3	(5,0)

AAA olan hastaların farklı atak gruplarındaki cinsiyet dağılımı incelendiğinde hem erkek hem de kız çocuklarda en fazla peritonit +ateş grubu görülmüştür. İkinci en fazla hasta grubu erkeklerde artrit +ateş (%27,3) iken kız çocuklarda ateş atağı (%18,5) görülmüştür.

Çalışmaya katılan grupların periferik venöz kandan izole edilen NEU yüzdesi ve izole edilen NEU sayısı ($X10^3$ uL) ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Çalışma kapsamındaki çocukların tam kan sayımı NEU yüzdelerinin (CBC-yüzde) göre karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Atak	89,7 $\pm$ 9,3	92,8	(44,9 - 99,2)		
Remisyon	86,5 $\pm$ 10,9	91,9	(55,7 - 95,7)	5,492	0,064
Kontrol	85,8 $\pm$ 9,1	86,7	(61,3 - 95,8)		

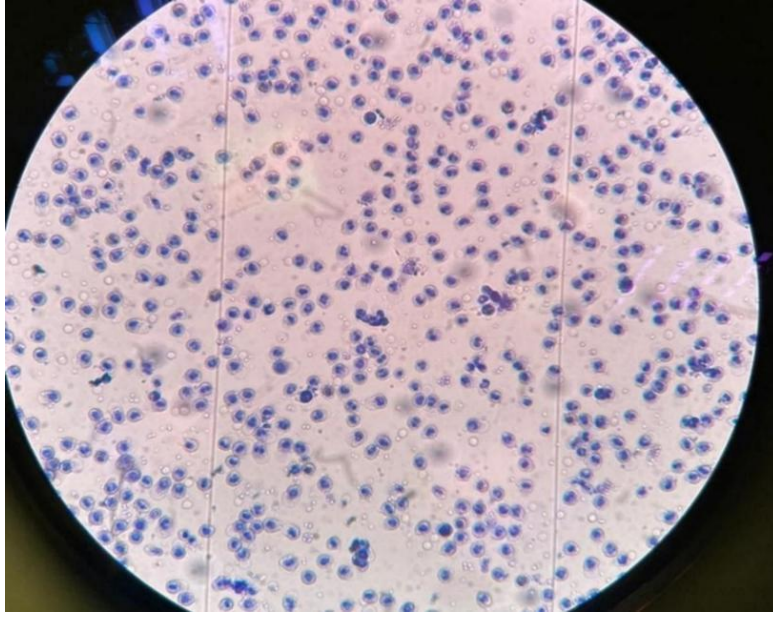
Kruskal-Wallis H testi

Çizelge 4.6. Çalışma kapsamındaki çocukların izole edilen NEU sayılarının ($nx10^3/\mu L$) karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Atak	4,46 $\pm$ 6,65	2,50	(0,10 - 40,90)		
Remisyon	1,50 $\pm$ 1,57	0,70	(0,40 - 4,90)	4,878	0,087
Kontrol	3,26 $\pm$ 3,92	1,20	(0,10 - 12,80)		

Kruskal-Wallis H testi

Kandan izole edilen, morfolojik inceleme için metilen mavisi ile boyanan nötrofillerin ışık mikroskobu altındaki (İmmersiyon objektifi (x100)) görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Nötrofillerin metilen mavisini boyası ile boyanması (İmmersiyon objektifi (x100))

Çizelge 4.7. Çalışma gruplarının tam kan sayımındaki WBC* sayılarına ($\text{nx}10^3/\mu\text{L}$) göre karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Atak	13730,0 $\pm$ 4566,2 ^A	13400,0	(3300,0 - 25234,0)		
Remisyon	6432,0 $\pm$ 2265,6 ^B	6500,0	(3700,0 - 11000,0)	28,546	<0,001
Kontrol	7566,8 $\pm$ 3281,8 ^B	6530,0	(4100,0 - 15400,0)		

One-way ANOVA

Farklı büyük harfler istatistiksel olarak farklı grupları gösterir.

*WBC: Beyaz kan hücresi (lökosit)- hematositometre ile tam kan sayımı testinde toplam sayısı

Çizelge 4.7’de görüldüğü üzere kontrol, remisyon ve AAA hasta gruplarında tam kan sayımında lökosit (WBC) ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Tukey çoklu karşılaştırma testi sonucunda atak grubundaki hastaların WBC değerleri ortalaması remisyon ($p < 0,001$) ve kontrol ($p < 0,001$) grubunda yer alan çocuklardan anlamlı derecede yüksektir. Remisyon ve kontrol grubu çocuklar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p = 0,712$).

Çizelge 4.8. Çalışma gruplarının serum AAT* düzeylerine (mg/dL) göre karşılaştırılması

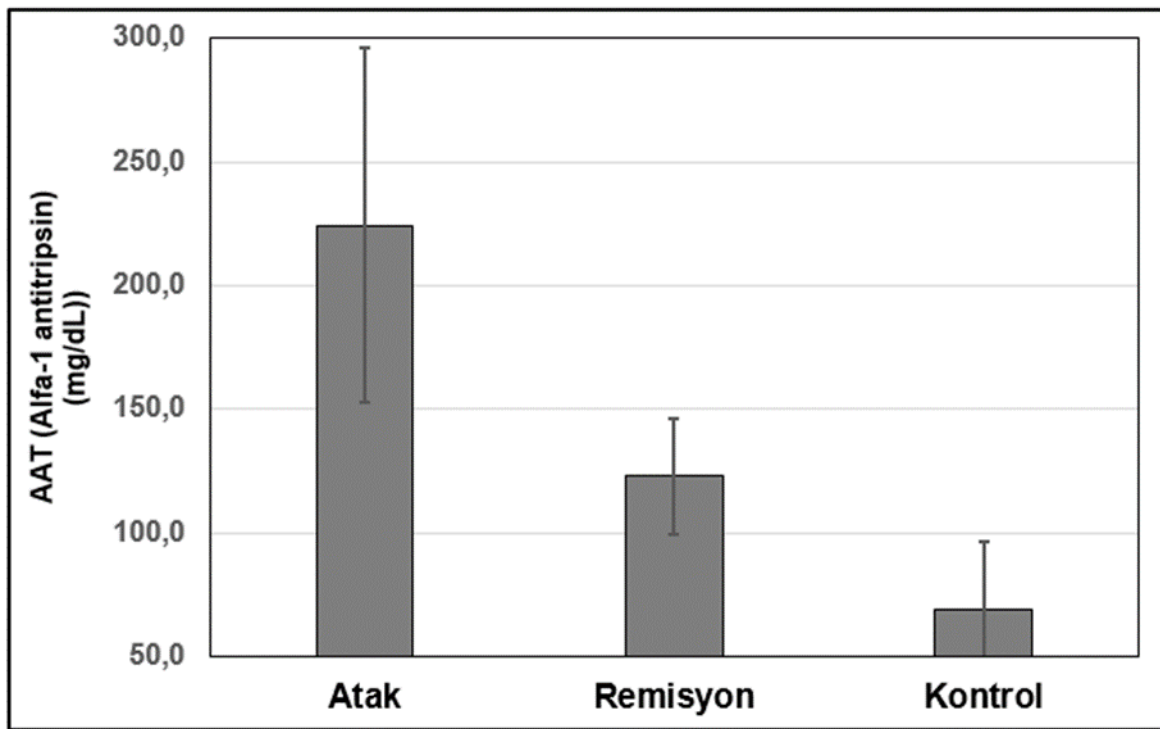
Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Atak	224,3 $\pm$ 71,8 ^A	213,5	(112,0 - 397,0)		
Remisyon	123,0 $\pm$ 23,3 ^B	114,0	(98,0 - 182,0)	51,719	<0,001
Kontrol	68,8 $\pm$ 27,5 ^C	64,0	(23,0 - 116,0)		

One-way ANOVA

Farklı büyük harfler istatistiksel olarak farklı grupları gösterir.

*AAT (Alfa-1 antitripsin)

Serum AAT düzeyi ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Her üç grubun AAT ortalamaları birbirinden farklıdır. Tukey çoklu karşılaştırma testi sonucunda atak grubundaki hastaların serum AAT düzeyi ortalaması remisyon grubu hastalardan ($p<0,001$) ve kontrol grubu hastalardan ($p<0,001$) anlamlı derecede yüksektir. Remisyon grubu hastaların serum AAT düzeylerinin ortalaması da kontrol grubu hastalardan anlamlı derecede yüksektir ($p=0,034$). Atak, remisyon ve kontrol gruplarının serum AAT düzeyi açısından karşılaştırmaları ortalamalar ve standart sapmalar ile bar grafik olarak da Şekil 4.2’de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Serum AAT düzeyi ortalamalarının atak, remisyon ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması

Çizelge 4.9. Çalışma gruplarının NETozis ölçüm (mU/ml) değerlerine göre karşılaştırılması

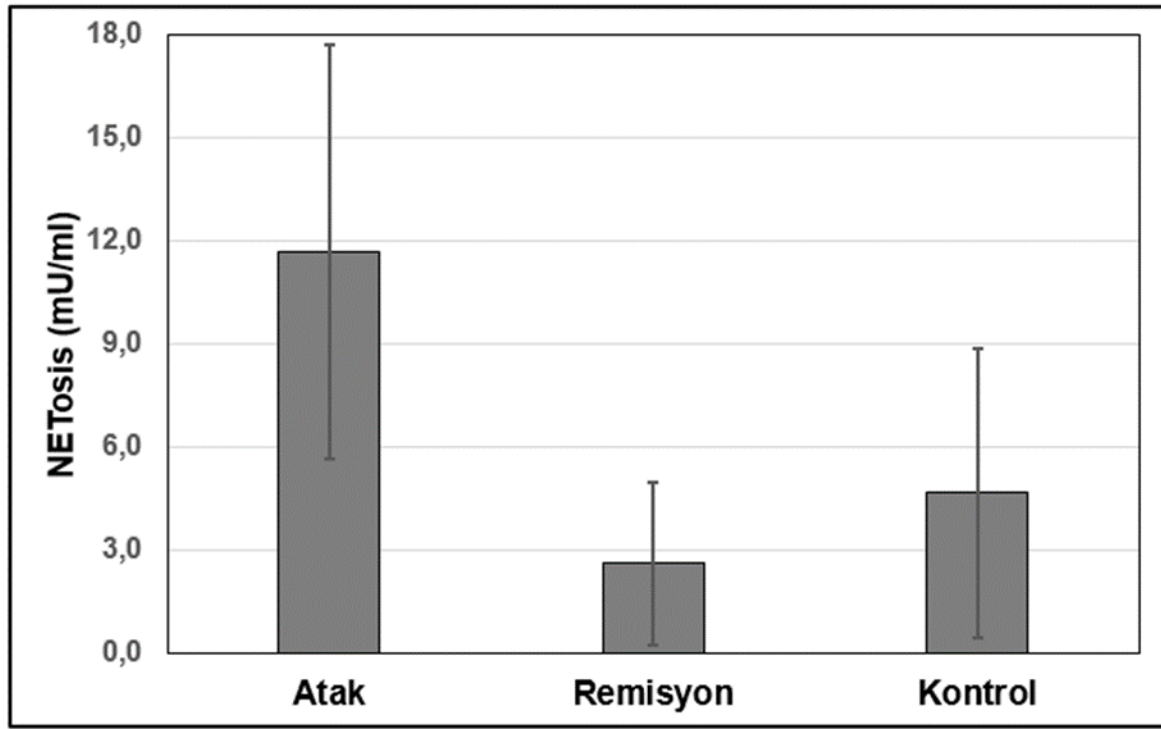
Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Atak	11,682 $\pm$ 6,015 ^A	10,905	(1,748 -30,317)		
Remisyon	2,628 $\pm$ 2,359 ^B	1,594	(0,548 -8,680)	40,067	<0,001
Kontrol	4,680 $\pm$ 4,203 ^B	4,203	(0,123 -14,288)		

Kruskal-Wallis H testi

Farklı büyük harfler istatistiksel olarak farklı grupları gösterir.

NETozis ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U çoklu karşılaştırma testi sonucunda atak

grubundaki hastaların NETozis değerleri ortalaması remisyon ($p<0,001$) ve kontrol ($p<0,001$) grubunda yer alan çocuklardan anlamlı derecede yüksektir. Remisyon ve kontrol grubu çocuklar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,791$). Şekilsel gösterimi Şekil 4.3’de verilmiştir. Atak, remisyon ve kontrol gruplarının NETozis ölçüm değerleri açısından karşılaştırmaları ortalamalar ve standart sapmalar ile bar grafik olarak da Şekil 4.3’te sunulmuştur.



Şekil 4.3. NETozis ölçüm değeri ortalamalarının atak, remisyon ve kontrol grupları arasında karşılaştırılması

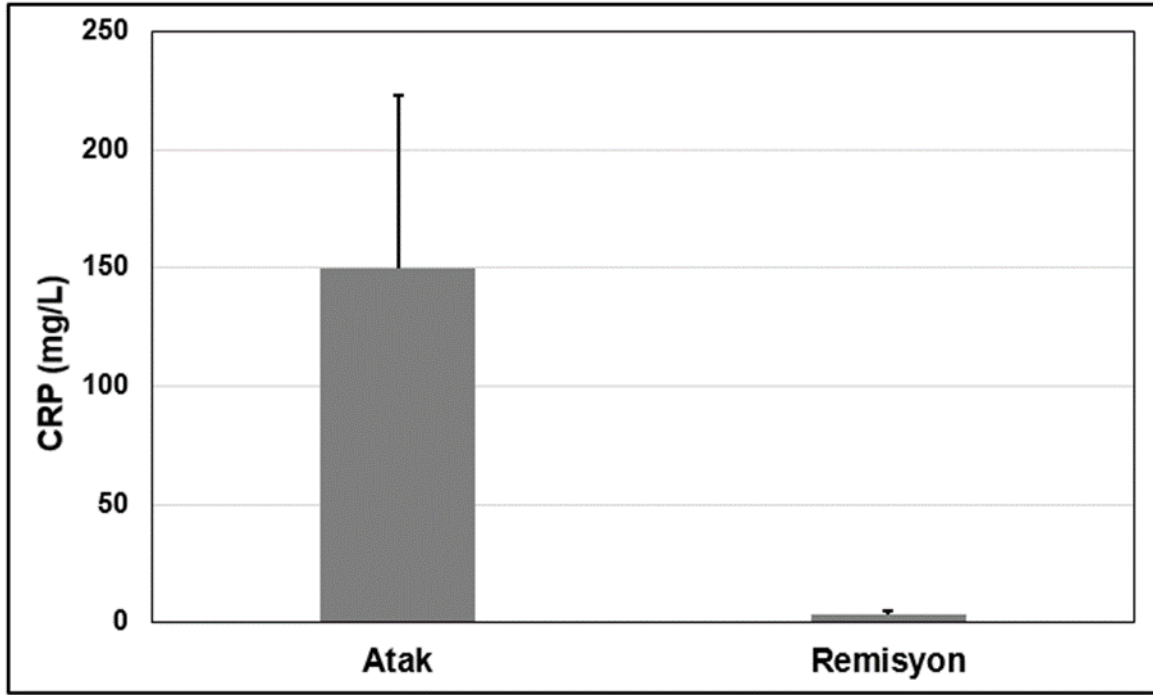
Çizelge 4.10. Çalışma kapsamındaki AAA atak ve remisyon çalışma gruplarının CRP (mg/L) değerlerine göre karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Atak	150,0 $\pm$ 73,2	146,0	(28,0 - 322,0)	15,466	<0,001
Remisyon	3,8 $\pm$ 1,3	4,0	(1,0 - 5,0)		

Mann-Whitney U-test

AAA tanısı almış, atak ile gelen ve remisyon gruplarındaki hastaların kan CRP değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Atak grubunun CRP değerleri remisyon grubundan anlamlı derecede yüksektir. Bir enflamasyon belirteci olan CRP’nın sağlıklı insanda bakılmasının anlamlı olmaması nedeni ile kontrol

grubunda CRP ölçülmemiştir. Şekilsel gösterimi Şekil 4.4’de verilmiştir. Atak ve remisyon gruplarının CRP ölçüm değerleri açısından karşılaştırmaları ortalamalar ve standart sapmalar ile bar grafik olarak da Şekil 4.4’te sunulmuştur.



Şekil 4.4. Çalışma kapsamındaki AAA atak ve remisyon gruplarının kan CRP değerlerinin ortalamalarının açısından karşılaştırılması

Atak türü ile çalışılan çalışmada ölçülen belirteçlerin (NETozis ölçümü, serum AAT düzeyi, kan CRP değeri) etkileşiminin daha iyi değerlendirilebilmesi amacı ile; çalışmaya dahil edilen AAA hastası çocuklarda görülen dokuz farklı atak türünün bazıları birleştirilerek dört gruba indirgenmiştir. Özellikle farklı serozal zar tutulumu (peritonit veya plörit), iki serozal zarın birlikte tutulumu ve bu serozal tutulumlarının olmadığı ancak ateş görülen olguların ölçülen belirteçler açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır. “Sadece ateş” ve “ateş+artrit” grupları birinci atak grubu (X), “plörit+ateş” grubu ikinci grup (Y), “peritonit”, “peritonit+ateş”, “peritonit+artrit+ateş” ve “peritonit+artrit” grupları üçüncü grup (Z) ve “Plörit+peritonit” ve “Plörit+peritonit+ateş” grupları dördüncü grup (W) olarak belirlenmiştir. NETozis, AAT ve CRP ölçümleri bakımından bu dört gruba ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları sırasıyla Çizelge 4.11, Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13’de sunulmuştur.

Çizelge 4.11. Çalışma kapsamındaki farklı AAA atak grupların NETozis ölçüm değerlerinin (mU/ml) karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
X (n: 21)	11,447 $\pm$ 6,724	12,040	(1,748 -29,829)	0,564	0,905
Y (n: 10)	12,308 $\pm$ 5,479	13,033	(5,105 -18,920)		
Z (n: 23)	11,034 $\pm$ 4,011	10,889	(4,068 -18,409)		
W (n: 6)	13,942 $\pm$ 10,589	9,653	(2,792 -30,317)		

Kruskal-Wallis H testi

X: “Sadece ateş” ve “ateş+artrit” grupları

Y: “Plörit + ateş” grubu

Z: “Peritonit”, “peritonit + ateş”, “peritonit + artrit + ateş”, “peritonit + artrit” grupları

W: “Plörit + peritonit” ve “plörit + peritonit + ateş” grupları

X, Y, Z ve W hasta gruplarında NETozis değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.12. Çalışma kapsamındaki farklı AAA atak gruplarının serum AAT* düzeylerinin (mg/dL) karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
X (n: 21)	194,9 $\pm$ 42,4 ^{A,C}	198,0	(119,0 -262,0)	14,981	0,002
Y (n: 10)	279,1 $\pm$ 58,4 ^B	272,0	(204,0 -371,0)		
Z (n: 23)	206,3 $\pm$ 66,8 ^{A,C}	207,0	(112,0 -361,0)		
W (n: 6)	304,8 $\pm$ 94,6 ^{A,B,C}	323,5	(167,0 -397,0)		

Kruskal-Wallis H testi

*AAT (Alfa-1 antitripsin)

X: “Sadece ateş” ve “ateş+artrit” grupları

Y: “Plörit + ateş” grubu

Z: “Peritonit”, “peritonit + ateş”, “peritonit + artrit + ateş”, “peritonit + artrit” grupları

W: “Plörit + peritonit” ve “plörit + peritonit + ateş” grupları

Serum AAT ölçümleri açısından X, Y, Z ve W hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U çoklu karşılaştırma testi sonucunda Y grubu hastaların AAT ölçümlerinin ortalamaları X grubundan ($p=0,014$) ve Z grubundan ($p=0,036$) anlamlı derecede yüksektir. X grubu ile Z ve W grupları arasında (sırasıyla $p=0,669$ ve $p= 0,051$), Y grubu ile W grubu arasında ($p=0,923$) ve Z grubu ile W grubu arasında ($p=0,103$) anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.13. Çalışma kapsamındaki farklı AAA atak gruplarında kan CRP değerlerinin (mg/L) karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
X (n: 21)	142,9 $\pm$ 78,4	142,0	(28,0 -312,0)	3,429	0,330
Y (n: 10)	143,9 $\pm$ 68,8	146,0	(34,0 -234,0)		
Z (n: 23)	146,2 $\pm$ 69,9	148,0	(48,0 -322,0)		
W (n: 6)	199,3 $\pm$ 72,1	205,5	(86,0 -286,0)		

Kruskal-Wallis H testi

X: “Sadece ateş” ve “ateş+artrit” grupları

Y: “Plörit + ateş” grubu

Z: “Peritonit”, “peritonit + ateş”, “peritonit + artrit + ateş”, “peritonit + artrit” grupları

W: “Plörit + peritonit” ve “plörit + peritonit + ateş” grupları

X, Y, Z ve W hasta gruplarında kan CRP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmaya dahil edilen AAA hastası çocuklarda görülen dokuz farklı atak türünden dört grubun (Sadece ateş, artrit+ateş”, plörit+ateş ve peritonit ateş) arasında NETozis, serum AAT düzeyi ve kan CRP değeri ölçümleri bakımından tanımlayıcı istatistikler ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları sırasıyla Çizelge 4.14, Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16’da sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Çalışma kapsamındaki ateş içeren farklı AAA atak gruplarının NETozis ölçüm değerlerinin (mU/ml) karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Sadece ateş (n: 8)	11,180 $\pm$ 6,840	10,692	(2,637 -24,245)	0,651	0,885
Artrit+Ateş (n: 13)	11,611 $\pm$ 6,927	12,353	(1,748 -29,829)		
Plörit+Ateş (n: 10)	12,308 $\pm$ 5,479	13,033	(5,105 -18,920)		
Peritonit+Ateş (n: 18)	11,313 $\pm$ 3,680	10,889	(5,477 -18,409)		

Kruskal-Wallis H testi

Farklı atak gruplarında NETozis ölçüm değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0.05$).

Çizelge 4.15. Çalışma kapsamındaki ateş içeren farklı AAA atak gruplarının serum AAT* düzeylerinin (mg/dL) karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Sadece ateş (n: 8)	180,9 $\pm$ 45,3 ^A	178,0	(123,0 -262,0)	11,987	0,007
Artrit+Ateş (n: 13)	203,5 $\pm$ 39,9 ^A	207,0	(119,0 -260,0)		
Plörit+Ateş (n: 10)	279,1 $\pm$ 58,4 ^B	272,0	(204,0 -371,0)		
Peritonit+Ateş (n: 18)	206,5 $\pm$ 67,7 ^A	209,5	(112,0 -361,0)		

Kruskal-Wallis H testi

*AAT (Alfa-1 antitripsin)

Serum AAT düzeylerini açısından farklı atak grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U çoklu karşılaştırma testi sonucunda “Plörit+ateş” grubu hastalarının serum AAT düzeylerinin ortalamaları sadece ateş grubundan ($p=0,008$), artrit+ateş grubundan ($p=0,011$) ve peritonit+ateş grubundan ($p=0,006$) anlamlı derecede yüksektir. Sadece ateş grubu ile artrit+ateş grubu arasında ($p=0,316$), sadece ateş grubu ile peritonit+ateş grubu arasında ($p=0,299$) ve artrit+ateş grubu ile peritonit+ateş grubu arasında ($p=0,979$) anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.16. Çalışma kapsamındaki ateş içeren farklı AAA atak gruplarının kan CRP değerlerinin (mg/L) karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# p-değeri
Sadece ateş (n: 8)	124,5 $\pm$ 66,1	122,5	(28,0 -242,0)	0,851	0,837
Artrit+Ateş (n: 13)	154,2 $\pm$ 85,7	143,0	(45,0 -312,0)		
Plörit+Ateş (n: 10)	143,9 $\pm$ 68,8	146,0	(34,0 -234,0)		
Peritonit+Ateş (n: 18)	155,8 $\pm$ 73,1	154,5	(48,0 -322,0)		

Kruskal-Wallis H testi

Çizelge 4.16 ‘da görüldüğü gibi çizelgedeki atak gruplarında kan CRP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Atak grubundaki dokuz alt gruptan plörit içeren gruplar “Plöritli” ve plörit içermeyen gruplar “Plöritsiz” olarak iki gruba ayrılmış ve bu iki grubun NETozis, serum AAT düzeyi ve kan CRP değeri ölçümleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması Çizelge 4.17’de verilmiştir.

NETozis ve kan CRP değeri ölçümleri bakımından “plöritli” ve “plöritsiz” gruplar arasında anlamlı fark yoktur ($p>0,05$). Serum AAT düzeylerine göre ise “plöritli” ve “plöritsiz” gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Plöritli grubun serum ATT düzeylerinin ortalaması plöritsiz gruptan anlamlı derecede yüksektir.

Çizelge 4.17. Plöritli ve Plöritsiz atak gruplarının NETozis, serum AAT düzeyi ve kan CRP değeri ölçümlerine göre karşılaştırılması

Değişken	Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	#p-değeri
NETozis ölçümü (mU/ml)	Plöritli	12,921 $\pm$ 7,487	10,938	(2,792 -30,317)	0,493
	Plöritsiz	11,231 $\pm$ 5,413	10,905	(1,748 -29,829)	
Serum AAT düzeyi (mg/dL)	Plöritli	288,8 $\pm$ 72,1	278,0	(167,0 -397,0)	<0,001
	Plöritsiz	200,8 $\pm$ 56,1	206,5	(112,0 -361,0)	
Kan CRP değeri (mg/L)	Plöritli	164,7 $\pm$ 73,1	175,0	(34,0 -286,0)	0,249
	Plöritsiz	144,6 $\pm$ 73,3	142,5	(28,0 -322,0)	

Mann-Whitney U test

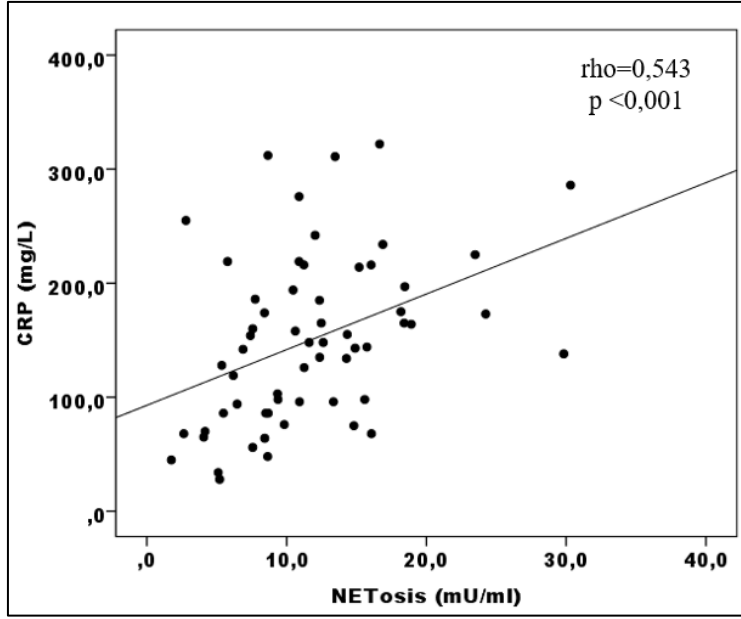
Atak, remisyon ve kontrol gruplarında NETozis, AAT ve CRP değişkenleri arasındaki korelasyonlar ve kontrol grubunda ise NETozis ile AAT değişkenleri arasındaki korelasyonlar Çizelge 4.18’de, anlamlı çıkan korelasyona ilişkin şekilsel gösterim Şekil 4.5’de sunulmuştur.

Çizelge 4.18. Çalışma kapsamındaki farklı AAA atak, remisyon ve kontrol gruplarında değişkenler arasındaki korelasyonlar

Gruplar	NETozis ile AAT		NETozis ile CRP		AAT ile CRP	
	rho	p-değeri	rho	p-değeri	rho	p-değeri
Atak	0,047	0,722	0,453	<0,001	-0,042	0,749
Remisyon	-0,266	0,337	0,397	0,142	0,259	0,352
Kontrol	-0,066	0,801				

rho: Spearman korelasyon katsayısı

Atak grubunda NETozis ölçümü ile kan CRP değeri arasında orta düzeyde pozitif anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). NETozis ölçümü ile serum AAT düzeyi değişkenleri arasında ve serum AAT düzeyi ile kan CRP değeri değişkenleri arasında ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). Remisyon grubunda NETozis ölçümü ile serum AAT düzeyi değişkenleri arasında, NETozis ölçümü ile kan CRP değeri değişkenleri arasında ve serum AAT düzeyi ile kan CRP değeri değişkenleri arasında ilişki anlamsızdır ($p>0,05$). Kontrol grubunda ise sadece NETozis ölçümü ile serum AAT düzeyi değişkenleri arasındaki ilişki incelenmiş ve anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).



Şekil 4.5. Atak grubunda NETosis ölçümü ile kan CRP değeri değişkenleri arasındaki korelasyon

Çizelge 4.19. Çalışma kapsamındaki AAA atak ve remisyon gruplarının mutasyon durumlarının dağılımı*

Mutasyon durumu	Atak		Remisyon		Toplam		Ki-kare değeri	P-değeri
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)		
Homozigot	11	(18,3)	3	(20,0)	14	(18,7)	2,528	0,470
Heterozigot	24	(40,0)	9	(60,0)	33	(44,0)		
Compant heterozigot	12	(20,0)	1	(6,7)	13	(17,3)		
Yok	13	(21,7)	2	(13,3)	15	(20,0)		
Toplam	60		15		75			

*Değerler frekans ve yüzde olarak verilmiştir.

Çizelge 4.19’da görüldüğü üzere AAA remisyon ve hasta grupları arasında mutasyon varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (p=0,470).

Çizelge 4.20. AAA hastalarının atak ve remisyon gruplarında mutasyonların heterozigot, homozigot ve compant heterozigot durumlarının dağılımı*

Mutasyonlar	Mutasyon durumu						Toplam	
	Heterozigot		Homozigot		Compant heterozigot			
E148Q	3	(9,1)	0	(0)	7	(26,9)	10	(13,7)
M680I	7	(21,1)	3	(9,1)	2	(7,7)	12	(16,4)
M694I	5	(15,2)	1	(7,1)	0	(0)	6	(8,2)
M694V	9	(27,3)	10	(71,4)	9	(34,6)	28	(38,4)
V726A	7	(21,2)	0	(0)	7	(26,9)	14	(19,2)
R202Q	2	(6,1)	0	(0)	1	(7,1)	3	(4,1)
Toplam	33		14		26		73	

*Değerler frekans ve yüzde olarak verilmiştir.

AAA hastalarının atak ve remisyon gruplarında mutasyonların heterozigot, homozigot ve compant heterozigot olmalarına göre değerlendirildiğinde en fazla hasta her üç durumda da sırasıyla (%27.3, %71.4,%34,6) M694V mutasyonunda bulunmuştur (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.21. Mutasyon gruplarının NETosis (mU/ml) değerlerine göre karşılaştırılması

Mutasyon durumu	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# P-değeri
Homozigot (n=14)	9,138 $\pm$ 5,863	9,185	(0,996 - 18,920)	0,629	0,890
Heterozigot (n=33)	9,206 $\pm$ 5,677	9,378	(0,600 - 23,488)		
Compant heterozigot (n=13)	12,235 $\pm$ 8,983	9,345	(0,874 - 30,317)		
Mutasyon yok (n=15)	9,969 $\pm$ 6,837	8,639	(0,548 - 24,245)		

Kruskal-Wallis H test ki-kare değeri

Çizelge 4.22. Mutasyon gruplarının AAT* (mg/dL) değerlerine göre karşılaştırılması

Mutasyon durumu	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# P-değeri
Homozigot (n=14)	208,8 $\pm$ 90,5	211,5	(98,0 - 387,0)	0,515	0,916
Heterozigot (n=33)	196,9 $\pm$ 73,2	197,0	(101,0 - 371,0)		
Compant heterozigot (n=13)	210,7 $\pm$ 66,8	206,0	(103,0 - 328,0)		
Mutasyon yok (n=15)	209,5 $\pm$ 84,7	198,0	(110,0 - 397,0)		

Kruskal-Wallis H test ki-kare değeri

*AAT (Alfa-1 antitripsin)

Çizelge 4.23. Mutasyon gruplarının CRP (mg/L) değerlerine göre karşılaştırılması

Mutasyon durumu	Ortalama $\pm$ SS	Medyan	(min - max)	Test istatistiği	# P-değeri
Homozigot (n=14)	127,1 $\pm$ 89,6	146,5	(2,0 - 276,0)	3,203	0,361
Heterozigot (n=33)	109,4 $\pm$ 92,1	98,0	(1,0 - 312,0)		
Compant heterozigot (n=13)	153,7 $\pm$ 73,1	165,0	(4,0 - 286,0)		
Mutasyon yok (n=15)	111,1 $\pm$ 89,5	86,0	(5,0 - 322,0)		

Kruskal-Wallis H test ki-kare değeri

Çalışmaya alınan AAA hastalarının atak ve remisyon gruplarında mutasyonların heterozigot, homozigot ve bileşik heterozigot olmalarına göre NETosis, serum AAT düzeyi ve kan CRP değerleri açısından karşılaştırıldığında her üç durumda da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (sırası ile p=0,890; p=0,916; p=0,361) (Çizelge 4.21, Çizelge 4.22, Çizelge 4.23). Ancak mutasyon gruplarının NETosis ölçüm değerleri açısından karşılaştırılmasında, en yüksek NETosis ölçüm değeri ortalaması (30,317 mU/ml) bileşik heterozigot mutasyon grubunda görülmüştür.

Çizelge 4.24. Farklı atak grupları ve remisyon grubunda heterozigot, homozigot ve compant heterozigot mutasyonların dağılımı

Mutasyonlar	Mutasyon durumu								Toplam	
	Heterozigot		Homozigot		Compant heterozigot		Mutasyon yok			
Atak grubu										
Ates	1	(7,1)	4	(12,1)	1	(7,7)	2	(13,3)	8	(10,7)
Peritonit	1	(7,1)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1,3)
Peritonit+Plorit+Ates	1	(7,1)	2	(6,1)	1	(7,7)	0	(0)	4	(5,3)
Peritonit+Artrit+Ates	0	(0)	2	(6,1)		-	1	(6,7)	3	(4,0)
Artrit + Ates	1	(7,1)	5	(15,2)	4	(30,8)	3	(20,0)	13	(17,3)
Plorit + Ates	1	(7,1)	4	(12,1)	3	(23,1)	2	(13,3)	10	(13,3)
Peritonit + Ates	4	(28,6)	7	(21,2)	3	(23,1)	4	(26,7)	18	(24,0)
Peritonit + Artrit	1	(7,1)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	1	(1,3)
Peritonit + Plorit	1	(7,1)	0	(0)	0	(0)	1	(6,7)	2	(2,7)
Remisyon grubu	3	(21,4)	9	(27,3)	1	(7,7)	2	(13,3)	15	(20,0)
Toplam	14		33		13		15		73	

Çizelge 4.24. ‘de çalışma kapsamında dokuz farklı atak grubu ve remisyon grubunda saptanan mutasyonlar görülmektedir.

5. TARTIŞMA

İlk olarak 1945'te Siegal tarafından “benign paroksizmal peritonit” adı altında tanımlanmış olan Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) (7), periyodik ateş, karın ağrısı, döküntü, peritonit, plevrit, artralji ve artrit gibi belirti ve bulgular ile ataklar şeklinde kendini gösteren otoenflamatuvar bir hastalık olup atakların sıklığı ve süresi değişkendir. (3-6). 1951’de AAA’in otozomal resesif olarak ailevi geçiş özelliği ve amiloidoz ile bağlantısı tespit edilmiştir (8-10). Özellikle Akdeniz kökenli etnik gruplarda, en yaygın olarak Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar arasında görülen AAA’nın Türkiye’de prevalansı yaklaşık 1:1000 olup ülkemiz en yüksek AAA hastası sayısına sahip ülke olarak dikkat çekmektedir. (12,13). AAA ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olsa da hastalığın immünopatofizyolojisi tam olarak çözümlenememiştir. Bu nedenle, hastalığın ve atakların gelişmesine neden olan mekanizmaların daha iyi anlaşılması, ataksız geçirilen zamanların uzatılması ve hastalığın tedavisi açısından çok yararlı olacaktır.

Sunulan bu tez çalışması AAA’da hastalık sürecine eşlik eden enflamatuvar immünobiyolojik mekanizmaların ve sinyal yollarının daha iyi anlaşılmasını, AAA’nın patogeneze yönelik yeni bilgiler sunmayı ve hastalığın yönetimi ile tedavisinde yenilikçi stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlamayı hedefleyerek planlanmıştır. Elde edilen sonuçlar hem AAA’nın immünopatofizyolojisine yönelik temel anlayışı derinleştirmekte hem de klinik izleme ve tedavi açısından önemli ipuçları sunmaktadır. Bu kapsamda, bu çalışmada AAA hastası çocuklarda atak ve remisyonda NET formasyonu ve serum alfa-1 anti-tripsin (AAT) düzeylerini inceleyerek sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırmak amaçlanmıştır: AAA hastalarında farklı klinik tabloların nötrofil (NEU) aktivasyonu ve enflamatuvar biyobelirteçler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Farklı atak dönmelerinde enflamasyon ve NEU hücre ölümü mekanizmalarına odaklanarak, NETozis ve AAT seviyelerinin hastalık sürecindeki rolü kapsamlı bir şekilde araştırılırken, remisyon ve kontrol grubu ile karşılaştırmalar yapılmıştır. Araştırma sonuçları, AAA’nın, aktif enflamasyon döneminde NEU aktivitesinin belirgin şekilde arttığını ve bunun NETozis, periferik kandaki beyaz kan hücresi sayısı, serum CRP ve AAT düzeyleri gibi parametrelerde ölçülebilir değişikliklere yol açtığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar genel olarak literatürle uyumlu [342, 83, 343] olmakla birlikte, bazı özgün noktalar dikkat çekmektedir.

Çalışmaya dâhil edilen hastalar, kan örneği alındığı sırada, ateş, peritonit, plörit, artrit gibi ataklar sırasında görülen klinik semptomlarına göre gruplandırılmıştır. Bu gruplandırma, AAA'nın heterojen klinik özelliklerini anlamak için önemli bir araçtır. Bulgular, farklı klinik grupların enflamatuvar biyobelirteçler ve nötrofil aktivasyonu üzerinde farklı etkiler yarattığını göstermiştir. Sadece ateş ve diğer tek semptomlu atak grupları, enflamatuvar yük açısından daha düşük WBC, CRP gibi biyobelirteç seviyelerine sahiptir. Kombine enflamasyon gruplarında, örneğin, "Peritonit+Plörit+Ateş" grubunda, NETozis ve serum AAT seviyeleri en yüksek değerlerde bulunmuştur. Bu durum, literatür ile uyumlu olup kombine enflamatuvar durumların NEU aktivasyonu ve enflamatuvar yanıtı şiddetlendirdiğini düşündürmektedir [344]

Çalışmaya dâhil edilen AAAA hastalarının atak, remisyon grupları ve kontrol grubu arasında yaş ortalamaları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ek olarak, farklı AAA atak grupları arasında da yaş ortalamaları açısından fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). Çalışmaya dâhil edilen katılımcıların yaş ortalaması $11,10\pm4,1$ yıl olarak belirlenmiştir. Farklı atak gruplarındaki çocukların yaş dağılımı incelendiğinde en fazla hasta sayısı 3-8 yaş grubunda ($n:17$) olup, bu yaş grubunda en çok hasta "Artrit+ateş" atak grubunda ($n:5$, %29,4) bulunuyordu. Tüm yaş gruplarındaki AAA atak hastaları içinde ise en çok hasta "Peritonit+ateş" atak grubunda mevcuttu ($n:18$, %30). Yine tek tek yaş gruplarında en yüksek hasta sayısı 8,01-11 yaş grubundaki "Peritonit+ateş" grubunda bulunuyordu ($n:6$ %40). Bu sıralama, "Ateş+artrit" atağı ile seyreden durumların daha küçük yaşlarda yoğunlaştığını, daha karmaşık atakların ise genellikle daha ileri yaşlarda ve ateş ile ortaya çıktığını göstermektedir.

Belirtildiği gibi "Ateş+artrit" ile seyreden hastaların daha küçük yaş grubunda yoğunlaşması dikkat çekmektedir. Bu bulgu, daha erken yaşlarda ataklar sırasında ateşin yanında artrit semptomunun da baskın olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, yaş faktörünün diğer enflamatuvar semptomlar üzerindeki etkilerini daha kapsamlı değerlendirebilmek için daha geniş örneklemlemlerle ileri analizler yapılması önerilmektedir.

Sonuçta, atak grupları arasında yaş dağılımları benzer bulunmuş olup istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir. Bu durum, hastalık grupları arasında yaş faktörünün analiz sonuçları üzerinde bir yanlılık oluşturmadığını ve gruplar arası karşılaştırmaların yaş etkisinden bağımsız olarak yapılabildiğini göstermektedir. Çalışmaya dâhil edilen

katılımcıların yaş aralığının dengeli bir dağılım göstermesi, bu çalışmada enflamasyon süreçlerinin incelenmesinde elde edilebilecek sonuçlar üzerinde yaşa bağlı değişiklik olasılığının bertaraf edilmesini sağlamıştır.

Diğer bir yönden hastaların yaş dağılımı (3-18 yaş) pediatrik yaş grubu doğasına uygun olarak geniş bir aralıktadır. 3 yaş altındaki hastalar, hem bu yaş grubunda çalışma için gerekli miktarda kan almanın etik olarak çok uygun olmayabileceği hem de hastanın kooperasyon güçlüğü nedeni ile çalışmaya dâhil edilmemiştir. Çoğunlukla çocuk ve genç erişkin hastalarla çalışılması, AAA'nın çocukluk çağına başlamasıyla uyumludur. Ancak 18 yaşına kadar uzanan yaş aralığı, bu hastalığın bazı bireylerde geç tanı alabildiğini veya uzun yıllar boyunca kronik enflamasyonla seyredbildiğini düşündürmektedir. [348].

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarının atak, remisyon grupları ve kontrol grubu arasında cinsiyet dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Yine AAA hastalarının farklı atak gruplarındaki cinsiyet dağılımı incelendiğinde hem erkek hem de kız çocuklarda atak sırasında en fazla “Peritonit+ateş” görülmüştür. İkinci en fazla sayıda hasta erkeklerde “Artrit+ateş” (%27,3), kız çocuklarda ise “ateş” atak grubunda (%18,5) görülmüştür. Sonuçlar cinsiyetin AAA'nın farklı klinik tablolarında belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir. Çelikel ve arkadaşlarının [347] çalışmasında da benzer şekilde cinsiyetin AAA'nın farklı klinik tablolarında belirgin bir etkisi olmadığını gösterilmiştir. Ancak, daha önce yayınlanan bazı klinik çalışmalarda cinsiyet oranlarındaki farklılıklar dikkate değerdir [5,12]). Cinsiyet farklılıklarının AAA'nın klinik spektrumundaki etkilerini araştırmak için daha geniş örneklem grupları ve ayrıntılı analizler yapılmasını gerekebilir.

Çalışmamızda, AAA atak ve remisyon hasta grupları ile kontrol grubu arasında periferik venöz kandan izole edilen nötrofil (NEU) sayısı ve tam kandaki NEU yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu sonuç, sunulan çalışmanın protokole uygun olarak tüm gruplarda yüzde 85'in üzerinde NEU izolasyonu ile gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Burada sunulan çalışmada kontrol, AAA remisyon ve hasta gruplarında yapılan tam kan sayımında (CBC) beyaz kan hücresi (WBC) ölçümleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. AAA atak grubundaki hastaların WBC değerleri ortalaması remisyon ($p<0,001$) ve kontrol ($p<0,001$) grubunda yer alan çocuklardan yüksektir. Remisyon ve

kontrol grubu çocuklar arasında farklılık bulunmamıştır ($p=0,712$). Bu sonuçlar enflamasyon ile uyumlu olarak, hastalık aktivitesinin WBC ölçümü üzerinde belirgin etkileri olduğunu göstermektedir. Enflamasyonun şiddeti arttıkça WBC değerlerinin de belirgin bir şekilde yükselmiştir. Aktif enflamasyon sırasında WBC değerlerinin önemli ölçüde arttığı AAA hastalarında, özellikle “peritonit” ile birlikte görülen kombine ataklarda WBC sayısının en yüksek seviyelere ulaştığı görülmektedir. Remisyon ve kontrol gruplarındaki düşük WBC değerleri, enflamatuvar sürecin azaldığını ve bağışıklık aktivitesinin stabil olduğunu yansıtmaktadır. Literatürle uyumlu olarak WBC değerlerinin AAA hastalığında enflamasyon şiddetinin bir göstergesi olabileceğini ve bu parametrenin özellikle aktif atakların izlenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. [39, 47, 53,78]

Serum AAT düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Her üç grubun AAT ortalamaları birbirinden farklıdır. Atak grubundaki hastaların serum AAT düzeyi ortalaması remisyon grubundan ve sağlıklı kontrol grubundan anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Remisyon grubundaki hastaların serum AAT düzeylerinin ortalaması da kontrol grubundan anlamlı derecede yüksektir ($p<0,001$). Bu durum farklı klinik durumların AAT seviyeleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle “plörit” içeren kombine şiddetli enflamatuvar ataklarda AAT seviyelerinin daha yüksek olduğunu görülmüştür. Serum AAT seviyesi ortalaması “Plörit + ateş” grubunda en yüksek, kontrol grubunda ise tüm gruplar arasında en düşük değerdedir. Serum AAT seviyelerinin enflamasyon sırasında artışı, vücutta meydana gelen proteaz inhibitör dengesini düzenlemeye yönelik bir yanıt olarak kabul edilir. Bu durum, vücutta enflamasyonun şiddetini sınırlamaya çalışan doğal bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır [344,345] Ancak, “Peritonit+Plörit+Ateş” atağı görülen hasta grubundaki serum AAT seviyelerinin diğer gruplara kıyasla daha yüksek olması, yalnızca enflamasyonun varlığını ve şiddetini açıklamakla kalmayıp, aynı zamanda AAT'nin enflamatuvar süreci düzenlemeye yönelik bir adaptasyon mekanizması olarak devreye girdiğini de düşündürmektedir. Bu grup, enflamasyonun daha yoğun olduğu bir durumu yansıttığı için, proteaz aktivitesini baskılamak ve vücudun aşırı enflamatuvar yanıtını dengelemek amacıyla daha fazla AAT üretimi yapma ihtiyacı duyabilir. Bu, enflamasyonun aşırıya kaçmaması ve dokulara zarar vermemesi için vücudun uyguladığı bir düzenleme stratejisi olabilir [346]. Mazurca ve arkadaşları da bu konuyu 2024 tarihli derlemelerinde ayrıntılı olarak anlatmışlardır [344]. Bununla birlikte, bazı hasta gruplarında serum AAT düzeylerinin beklendiği kadar artmaması, enflamasyonun yetersiz bir şekilde regüle edildiğini veya AAT üretiminde

genetik farklılıklara bağlı bir azalma olduğunu gösteriyor olabilir. Yapılan çalışmalarda, vücudun enflamasyona karşı verdiği tepkinin bireysel farklılıklara dayalı olarak değişebileceğini işaret etmektedir. Örneğin, bazı genetik polimorfizmler, vücudun AAT üretimini yeterince artırmasını engelleyebilir [285]. Ayrıca, bazı hastalar, enflamasyonun şiddetini dengelemek için gerekli olan AAT üretimini yeterince sağlamakta zorlanabilirler. Bu da belirli hasta gruplarında AAT seviyelerinin beklenenin altında olmasına neden olabilir. AAT seviyelerinin yalnızca enflamasyonun bir sonucu olarak artmadığını, aynı zamanda enflamatuvar sürecin düzenlenmesine yönelik bir yanıt olarak da arttığını söylemek mümkündür. Bu bulgu, enflamasyonun şiddeti ve düzenlenmesiyle ilişkili karmaşık bir dengeyi ortaya koymaktadır ve her bireyin bu süreci farklı bir şekilde deneyimleyebileceğini gösterir. Bu bağlamda, AAT üretimi hem enflamasyonun şiddetine hem de bireysel genetik faktörlere dayalı olarak değişkenlik gösterebilir [284, 285, 286]. Yapılan çalışmada aldığımız sonuçlar, AAT seviyelerinin AAA hastalarının enflamatuvar durumlarını değerlendirmede bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, kontrol ve remisyon gruplarındaki düşük değerler, enflamasyon düzeyi ile AAT arasında güçlü bir ilişki olduğunu işaret etmektedir. Özellikle peritonit ve plörit gibi özellikle serozal zarları tutan yaygın enflamasyonla ilişkili klinik durumlarda AAT düzeylerinin arttığı dikkat çekmektedir.

Serum CRP değeri, enflamasyonun önemli bir biyobelirtecidir ve yüksek seviyeleri genellikle vücutta aktif bir enflamasyon sürecinin bulunduğunu gösterir [349]. Bu çalışmada kanda ölçülen CRP değeri açısından AAA atağı ile gelen hasta grubu ile AAA remisyon hastaları grubu arasında anlamlı fark bulunmuş olup, atak grubunun CRP değerleri remisyon grubundan anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,001$). Farklı atak gruplarında kan CRP değerleri arasında istatistiksel fark bulunmamış olmakla birlikte, “Plörit+peritonit” ve “Plörit+peritonit+ateş” atak grubundaki hastaların CRP ortalaması diğer gruplara kıyasla yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, bu grupların daha şiddetli bir enflamasyon yaşadığını ve bağışıklık sisteminin daha yoğun bir yanıt verdiğini göstermektedir. Remisyon grubundaki düşük CRP seviyesi, bu hastalarda enflamasyonun kontrol altına alındığını ve bağışıklık yanıtının normale döndüğünü göstermektedir. Kontrol grubunda CRP çalışılmadığı için verisi bulunmamakla birlikte, normalde CRP seviyesi çok düşük olacağı tahmin edilebilir. Anlaşılabileceği üzere CRP seviyeleri, enflamasyonun şiddeti ile doğrudan ilişkilidir. En yüksek CRP seviyeleri, şiddetli enflamasyonun ve bağışıklık sisteminin güçlü bir yanıt verdiği gruplarda gözlenirken, remisyon ve düşük enflamasyon durumlarındaki hastalarda CRP seviyeleri belirgin şekilde düşük bulunmuştur. Bu bulgular, CRP'nin enflamasyonun

izlenmesinde ve şiddetinin değerlendirilmesinde önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ottaviani ve arkadaşlarının [349] çalışmasında, CRP'nin sistemik enflamasyonun bir göstergesi olarak "AAT Eksikliği" tanı algoritmasındaki potansiyel değeri vurgulanmıştır. Sistemik enflamasyon sırasında CRP hızlı bir şekilde artış gösteren bir akut faz reaktanıdır (5-1000 kat), buna karşın AAT daha yavaş artış göstermektedir (2-3 kat). Bu farklı tepki mekanizması, sistemik enflamasyon varlığında AAT seviyelerinin yanlış yorumlanmasına neden olabilir. Bu durum özellikle tanı testlerinin gözden kaçmasına yol açabilir. Çalışmada, enflamasyon sırasında AAT seviyelerinin artışı nedeniyle PI*MZ taşıyıcılarının yaklaşık %80'inin doğru şekilde tanı alamayabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, literatürde, CRP seviyelerindeki bireyler arası farklılıkların CRP gen polimorfizmlerinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Bazı polimorfizmlerin (örneğin rs1205, rs1130864, rs3091244, rs3093077) CRP seviyelerinde %64'e varan artışa neden olabileceği bildirilmiştir [350]. Bu nedenlerle, AAA hasta gruplarında atak dönemindeki farklılar CRP gen polimorfizminden kaynaklanabilir; CRP değerlerindeki değişikliklerin polimorfizm çalışmaları ile birlikte değerlendirilmesi gerekliliği düşüncesindeyiz. Sonuç olarak, CRP seviyeleri, enflamasyonun şiddeti ile doğrudan ilişkilidir. En yüksek CRP seviyeleri, şiddetli enflamasyonun ve bağışıklık sisteminin güçlü bir yanıt verdiği gruplarda gözlenirken, remisyon ve düşük enflamasyon durumlarında hastalarda CRP seviyeleri belirgin şekilde düşük bulunmuştur. Bu bulgular, CRP'nin enflamasyonun izlenmesinde ve şiddetinin değerlendirilmesinde literatürle uyumlu olarak önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir [52, 78, 80].

Otoenflamasyon ve otoimmün hastalıklarda, doğal bağışıklık sistemi hücreleri, özellikle nötrofiller, organizmada doku hasarına yol açan iltihabi süreçlerde aktif rol alır; fagositoz ve degranülasyon sonrası nötrofillerin yaptığı NETozis, enfeksiyon alanında gösterdikleri son savunma mekanizmasıdır [268]. Otoenflamatuvar bir hastalık olan AAA'da yaptığımız çalışmamızda, hasta grupları olan atak ve remisyon grupları ile kontrol grubunu NETozis ölçüm sonuçlarına göre karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark bulunduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$). Atak gruplarındaki AAA hastalarının NETozis ölçüm değerleri ortalaması remisyon ve kontrol gruplarında yer alan çocuklardan anlamlı derecede yüksektir ($p<0,001$). Remisyon ve kontrol grubundaki çocuklar arasında ise istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamasına rağmen remisyon grubunda kontrol grubuna göre NETozis ölçümünün ortalama değeri daha düşüktür. Remisyonunda olan hastaların kullandıkları antienflamatuvar ilaçlara bağlı olarak nötrofil sayılarındaki azalma ve enflamasyonun

baskılanması sonucu remisyon grubunda NETozis ölçüm değerinin daha düşük bulunduğunu düşünmekteyiz [101]. NETozis, bağışıklık yanıtı sırasında NEU'lerin serbest bıraktığı DNA yapılarının bir sonucu olarak ortaya çıkar ve genellikle enflamasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir. Farklı atak gruplarında NETozis ölçüm değerleri karşılaştırılmasında NETozis oranlarının farklı olmadığı ve yüksek değerlerde olduğu görüldü. NETozisin enflamasyonla ilişkili olduğunu ve bağışıklık sisteminin bu tür durumlarla mücadele ederken daha güçlü bir yanıt verdiğini göstermektedir. Remisyon gruplarında NETozis düzeylerinin düşük olması, enflamasyonun regüle edildiğine ve bağışıklık yanıtının normalleştiğine; kontrol grubundaki sonuçlar ise bu grupta enflamasyonun neredeyse yok denecek kadar az olduğuna işaret etmektedir. Kanda ölçülen NETozis değeri, enflamasyonun yoğunluğuna ve şiddetine paralel olarak artış gösterebilir. Akciğer hastalıklarında ve SLE hastalarında NETozis değerlerinin tanı ve takipte kullanılabileceğini öneren çalışmalarda olduğu gibi çalışmamız da NETozisin AAA hasta ataklarında enflamasyonun izlenmesinde, tedavi ve şiddetinin değerlendirilmesinde önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir [225,367,369].

NETozis, serum AAT düzeyi, kan CRP değeri etkileşiminin daha iyi değerlendirilebilmesi amacı ile; çalışmaya dâhil edilen AAA hastası çocuklarda görülen dokuz farklı atak türünün bazıları birleştirilerek dört gruba indirgenmiştir. Özellikle farklı serozal zar tutulumu (peritonit veya plörit), iki serozal zarın birlikte tutulumu ve bu serozal tutulumlarının olmadığı ancak ateş görülen olguların, ölçülen belirteçler açısından karşılaştırıldığında, AAA atak gruplarının NETozis ve kan CRP ölçüm değerleri farklı bulunmazken, serum AAT ölçümleri açısından “Plörit+ateş” atak grubunda serum AAT düzeyi ortalamaları, “sadece Ateş”, “Ateş+artrit”, “sadece Peritonit”, “Peritonit+ateş”, “Peritonit+artrit+ateş” ve “Peritonit+artrit”atağı geçiren ancak plörit tutulumu olmayan grupların serum AAT düzeyi ortalamalarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$).. Akciğer yüzeyi havadaki patojenlere sürekli olarak maruz kalmakta ve bu durum sıklıkla hücresel bağışıklık tepkilerini tetiklemektedir. Bu tepkiler sonucunda akciğer dokusuna proteazlar ve oksidanlar salınmaktadır. Geniş spektrumlu antiproteaz aktivitesine sahip olan AAT, akciğerde yüksek düzeyde bulunmaktadır [284, 287]. Plöritin eşlik ettiği ataklarda yüksek AAT ve NEU aktivasyon nedeninin dokuda yüksek seviyede olan AAT olduğu düşünülmüştür. Plörit ataklarında yüksek serum AAT düzeyleri, AAA'nın yalnızca genetik faktörlerden değil, aynı zamanda enflamatuvar yükten de etkilendiğini ortaya koymaktadır. Yine çalışmamızda dokuz farklı atak türünde, ateş semptomu olan dört grubun (“sadece Ateş”, “Artrit+ateş”,

“Plörit+ateş” ve “Peritonit+ateş”) arasında NETozis ve kan CRP değeri ölçümleri arasında fark olmadığı gözlenirken, Serum AAT düzeylerini açısından farklı atak grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur: “Plörit+ateş” grubu hastalarının serum AAT düzeylerinin ortalamaları diğer üç gruptan anlamlı derecede yüksektir ($p<0,001$). AAT, proteaz inhibe edici etkisiyle enflamasyon sırasında doku hasarını önleyici bir rol oynar ve bu grubun yüksek AAT seviyeleri, enflamasyonun etkilerinin düzenlenmesi için ek bir mekanizma olarak işlev görebilir. Bu nedenle, plörit grubu olan hastalarda ölçülen yüksek serum AAT düzeyleri, hastaların göğüs ağrısının değerlendirilmesinde ve takibinde kullanılabilir. Farklı enflamatuvar tabloların AAA hastalarında belirgin biyobelirteç profilleri oluşturabileceğini, AAT'nin enflamasyonun düzenlenmesindeki rolü ve NEU'lerin NET oluşumu üzerindeki etkisi, gelecekteki tedavi stratejilerinin şekillendirilmesinde de yardımcı olabilir.

NETozis ve kan CRP değeri ölçümleri bakımından “plöritli” ve “plöritsiz” gruplar arasında anlamlı fark görülmezken ($p>0,05$), serum AAT düzeyleri “plöritli” grupta daha yüksektir ($p<0,05$). WBC sayısı, CRP değeri, NETozis ölçümü ve serum AAT düzeylerinin belirgin şekilde yüksek olduğu AAA ataklarında enflamasyonun şiddetinin arttığı ve bağışıklık sisteminin bu süreçte daha aktif rol oynadığı söylenebilir. Bu bulgular, Özellikle “plörit”in eşlik ettiği AAT hastalarında enflamasyonun şiddetini belirleyen ve regüle eden biyobelirteçler olarak önemli işlevler üstlendiğini ve tedavi sürecinde serum AAT izlenmesinin faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

AAA atak grubunda NETozis ölçümü ile kan CRP değerleri arasındaki pozitif anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). (Aktif enflamasyon grubunda, kan CRP ve NETozis ölçüm değerlerinin anlamlı artışı, enflamasyonun klasik belirteçleri olarak AAA hastalarının tanı ve izleminde bu parametrelerin önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Ayrıca CRP, NETozis ve AAT gibi biyobelirteçlerin, bu parametrelerle kombinasyonu, hastalığın daha ayrıntılı değerlendirilmesine katkı sağlayabilir. Bu çalışmamızın gösterdiği gibi, özellikle farklı enflamatuvar tabloların biyobelirteç profilleri farklılık gösterebilmektedir. Bu durum, AAA'nın fenotipik çeşitliliğini anlamak ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarını geliştirmek açısından önemlidir.

Çalışmaya dâhil edilen hastaların AAA açısından mutasyon verileri incelendiğinde, mutasyonların dağılımı açısından atak grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunmamıştır. Yani, mutasyonların hastaların klinik durumlarıyla doğrudan ilişkilendirilebileceğine dair bir bulgu elde edilmemiştir. Ancak, çalışmaya katılan AAA hastalarında M694V mutasyonu en fazla görülen (%38,4) mutasyon türü olmuştur. M694V mutasyonunun bu klinik durumu etkileyebileceği ihtimalini akıllara getirirse de genel olarak mutasyonların hastaların klinik ataklara etkisi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$). AAA hastalarının atak ve remisyon gruplarında mutasyonların heterozigot, homozigot ve bileşik (*compound*) heterozigot olmalarına göre değerlendirildiğinde her üç durumda da M694V mutasyonu en fazla hastada (%27,3, %71,4, %34,6) bulunmuştur. Bu sonuç, mutasyonların yalnızca genetik yatkınlık değil, aynı zamanda hastalıkların klinik seyrine etki edebilecek çeşitli diğer faktörlerle de etkileşimde olduğunu düşündürebilir. Bununla birlikte, diğer mutasyon türleri (M694I, M680I, E148Q, V726A) arasında belirgin bir yoğunlaşma olmadığı ve tüm hasta gruplarında mutasyonların eşit dağıldığı gözlemlenmiştir. IL-1 β 'ya bağlı otoenflamatuvar bir hastalık olan AAAA, klinik olarak IL-1 β blokajına yanıt verir [351, 352]. Ancak nötrofillerin de AAA'da önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [353, 354]. Ayrıca Apostolidou ve arkadaşları [355] nötrofillerin yaptığı NETozisin IL-1 β üretimini düzenlediğini göstermişlerdir. AAA hastalarından izole edilen nötrofillerin kısa süreli kültür çalışmalarında, sağlıklı bireylerin nötrofillerine kıyasla değişen gen ifadeleri gözlenmiş ve kaspaz-1, c-FOS, TLR2 ve MMP9 gen ifadelerinin arttığı kaydedilmiştir [356]. Buna göre, MEFV gen mutasyonları olan hastalarda nötrofil aktivasyonu artmaktadır ve bu durumun MEFV mutasyonlarının gen-doz etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [357]. Çalışmamızda da AAA mutasyonlarının hastalık gelişimi üzerinde tek başına belirleyici bir rol oynamadığını, daha geniş genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle atak kliniklerinin şekillendiğini düşündürmektedir. Ayrıca AAA ataklarının stresle tetiklendiğini öne süren çalışmalar da bulunmaktadır. Skendros ve arkadaşları [358] AAA hastalarında nötrofil aktivasyonunun ve NET oluşumunun stres kaynaklı enflamatuvar yanıtındaki rolünü araştırmıştır. Yazarlar, REDD1 (*regulated in development ment and DNA damage responses 1*) gibi stres kaynaklı proteinlerin AAA hastalarında yüksek seviyelerde ifade edildiğini ve nötrofillerin, özellikle remisyonadaki vakalarda otofaji direnci nedeniyle, otofaji aracılı NET oluşuna neden olduğunu bulmuşlardır. REDD1, pirin ve NALP3 ile otolizozomlarda lokalize olan bir proteindir. Pirinde gözlenen bu mutasyon nedeniyle otolizozomlardaki bu birliktelik bozularak NET aracılı IL-1 β salgılanmasını artırmakta ve daha fazla enflamasyona neden olmaktadır [357].

Çalışmaya alınan atak gruplarında, NETozis ölçümü ile serum AAT düzeyleri arasında yüksek korelasyon ($p>0.001$) bulunmuştur. Bu bulgu, serum AAT düzeylerinin artmasıyla birlikte NETozis formasyonunun da arttığını göstermektedir, bu da AAT'nin enflamatuvar süreçlerdeki rolünü ve NETozisle olan etkileşimini desteklemektedir. Ancak, NETozis ve AAT düzeyi ile mutasyonlar arasında herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p<0,05$). Bu, mutasyonların NETozis ve serum AAT düzeylerindeki değişimlerle doğrudan bir etkileşime girmediğini göstermektedir. M694V mutasyonu ise NETozis ve AAT düzeylerinin yüksek değerleri ile körele olduğu görülmüştür. Bu, M694V mutasyonunun bu iki biyobelirteç ile ilişkisinin olabileceği ancak bu ilişkinin istatistiksel anlam taşımadığı anlamına gelmektedir. Yani, bu mutasyonun NETozis ve AAT düzeyi ile ilişkisi, doğrudan bir etkileşimden çok, gözlenen bulgulara dayanarak daha fazla araştırılabilir bir alan olarak kalmaktadır. Genel olarak, NETozis formasyonu ve serum AAT düzeyi arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmiş ($p<0,05$). olsa da bu ilişkinin mutasyonlar ile doğrudan bir bağlantı kurmadığı görülmüştür. Bu da mutasyonların enflamasyonun biyobelirteçleri üzerindeki etkisinin, genetik faktörlerin ötesinde, daha karmaşık bir mekanizma ile şekillenebileceğini düşündürmektedir. AAT'nin NETozis üzerindeki etkisi, bu süreçte önemli bir rol oynayabileceğini, ancak genetik mutasyonların bu süreçler üzerinde belirleyici bir etkisi olmadığını ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, enflamatuvar hastalıkların genetik ve biyokimyasal süreçlerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılması gerektiğini işaret etmektedir.

Aktif enflamasyon grubunda CRP ve WBC seviyelerinin anlamlı artışı, enflamasyonun klasik belirteçleri olarak AAA hastalarının tanı ve izleminde bu parametrelerin önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Ancak NETozis ve AAT gibi biyobelirteçlerin bu parametrelerle kombinasyonu, hastalığın daha ayrıntılı değerlendirilmesine katkı sağlayabilir. Özellikle, bu çalışmanın gösterdiği gibi, farklı enflamatuvar tabloların biyobelirteç profilleri farklılık gösterebilmektedir. Bu durum, AAA'nın fenotipik çeşitliliğini anlamak ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarını geliştirmek açısından önemlidir.

Apostolidou ve ark.ları [22] NET'lerin AAA'deki rolünü ve bunların interleukin-1 beta (IL-1 β) üretimindeki katkısını araştırmıştır. AAA atakları sırasında, polimorfonükleer lökositlerin (PMN) IL-1 β ile süslenmiş NET'ler saldıgı gözlenmiştir. Buna karşın, remisyon dönemindeki PMN'lerin NET oluşumuna karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. IL-1 β 'nin NET yapılarında bulunması, NET'lerin enflamatuvar yanıtı tetikleyici bir rol üstlendiğini

göstermektedir [359, 360]. Ancak NET'ler aynı zamanda homeostatik bir negatif geri bildirim mekanizmasıyla kendi oluşumlarını sınırlayarak enflamasyonu düzenlemektedir. Remisyon dönemindeki AAA hastalarında düşük bazal otofaji seviyeleri tespit edilmiştir [361]. Bu durum, PMN'lerin NET oluşumuna olan duyarlılığını azaltarak, enflamasyonun tetiklenme eşiğini yükseltebilir. Otofaji indüksiyonunun, AAA ataklarında NET oluşumunu kolaylaştırdığı ve IL-1 β 'nin NET'ler aracılığıyla etkinleştirildiği gösterilmiştir [21, 362]. Bir başka çalışmada kolşisinin NET oluşumunu baskılamadığı, ancak IL-1 β üretimini azalttığı gösterilmiştir. DNaz I tedavisi ile NET'lerin yapısal bütünlüğünün bozulması, NET'lere bağlı IL-1 β 'nin biyolojik aktivitesini azaltmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma AAA patogenezinde IL-1 β taşıyan NET'lerin önemli bir rol oynadığını ve bunların hem enflamasyonu başlatıcı hem de sınırlayıcı işlevleri olduğunu ortaya koymaktadır. Düşük bazal otofaji seviyelerinin ve NET'lerin negatif geri bildirim mekanizmalarının, AAA inflamatuvar süreçlerinin düzenlenmesinde kritik birer homeostatik rol oynadığı düşünülmektedir [363].

Çalışmamızda elde edilen verilerde mutasyonlarla yüksek NET'ozis düzeyleri birlikteliğinde olduğu gibi Skendros ve ark.larına [364] göre de AAA, MEFV geninde mutasyonlarla ilişkili olan ve pirin proteinini kodlayan, en yaygın herediter periyodik ateş çeşidi olup, nötrofil aracılı enflamasyon ve IL-1 β ile ilişkili enflamasyonun anlaşılmasına yönelik araştırmalar için uygun bir model oluşturmaktadır. AAA'de pirin, nötrofiller ve monosit/makrofajlarda eksprese edilen ve enflamasyonu düzenleyen sitozolik bir proteindir. Pirin mutasyonlarının, enflamasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan inflamatuvar platformların (inflammozomlar) aktivasyonunu etkilediği gösterilmiştir. Son yıllarda pirinin kendi inflammozomunu oluşturabileceği ve bu mekanizmanın IL-1 β üretimini artırdığı anlaşılmıştır. AAA inflamatuvar atakları sırasında nötrofiller, otofajiye bağlı bir mekanizma ile sitoplazmik içeriklerini parçalamakta ve inflamatuvar yanıtı düzenleyen NET'leri salgılamaktadır. Bu NET'ler, IL-1 β taşımakta ve bu sitokinlerin periferik mononükleer hücrelerdeki üretimini artırmaktadır. Ayrıca, AAA hastalarında düşük bazal otofaji düzeylerinin hastalığın patogenezinde rol oynadığı gözlemlenmiştir. REDD1 proteini, AAA'de otofajiye tetiklenen enflamasyonu düzenleyen bir stres yanıt proteinidir. AAA'deki mutasyonlar inflammozomun otofajiye yıkımını önleyerek IL-1 β üretimini artırır. Bu mekanizma, strese bağlı AAA ataklarını açıklamakta ve yeni tedavi hedefleri sunmaktadır. AAA'nin klinik özellikleri arasında ateş, karın ağrısı ve monoartrit yer alır. Yunan AAA hastalarında kolşisine iyi yanıt alınırken, dirençli vakalarda IL-1 β inhibitörleri

etkili tedavi seçenekleri olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, AAA'nin klinik araştırmaları gut gibi diğer hastalıkların tedavisine de ışık tutmaktadır. AAA, nötrofillerin rolünü ve IL-1 β 'nin enflamasyondaki yerini anlamak için bir model oluşturmaktadır. Elde edilen bilgiler, daha karmaşık enflamatuvar hastalıkların patogenezinin anlaşılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Michailidou ve ark.ları [365] çalışmasında, anti-nötrofil sitoplazmik antikor (ANCA)-ilişkili vaskülit (AAV) ve büyük damar vaskülitlerinde (LVV) NET'lerin rolü incelenmiştir. Çalışma, granülomatöz polianjit (GPA, Wegener granülamatozu), mikroskobik polianjit (MPA), Takayasu arteriti (TAK) ve dev hücre arterit (GCA) hastalarında, hem hastalık aktifken hem de remisyon sırasında NET seviyelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterilmiştir. Tüm hasta gruplarında NET yıkımının bozulduğu belirtilmiştir; GPA ve MPA hastalarında anti-NET IgG antikorlarının varlığı, TAK hastalarında ise anti-histon antikorlarının NET seviyeleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, trombosit kaynaklı trombospondin-1 (TSP-1) seviyelerinin tüm vaskülit hastalarında yükseldiği ve NET oluşumuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. NET'lerin AAV'de, özellikle TNF- α ve lipopolisakkarit gibi uyaranlarla aktive edilen nötrofillerin, MPO ve PR3'ü hücre yüzeyine dışa aktardığı ve ANCA'nın bu antijenlere bağlanarak nötrofillerin NET oluşturmalarını tetiklediği tespit edilmiştir. Bu süreç, enflamatuvar endotelial hasara neden olmuştur. Ayrıca, trombositlerin nötrofillerle TLR9 aracılı CXCL4 salınımı yoluyla etkileşime geçerek NET oluşumuna katkı sağladığı ve bu yapının koagülasyon kaskadını aktive ettiği gösterilmiştir. LVV'de ise NET oluşumunun tam patogenezi bilinmemekle birlikte, histonlar gibi NET bileşenlerinin modifiye otoantijenler olarak otoantikorlarla hedef alındığı ve enflamasyonun sürdürüldüğü belirtilmiştir. Bu ve buna benzer olan bizim çalışmamızda da olduğu, NET oluşumunun ve yıkımının modülasyonunun, vaskülit ve AAA tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini öne sürmekteyiz.

Çalışmamızda hastalık aktivitesiyle doğrudan ilişkili olarak NET'lerin seviyelerinin sağlıklı bireylerle kıyaslandığında yüksek bulmamıza rağmen Michailidou ve ark.ları [365] vaskülit hastalarındaki NEU aktivasyonunun rolünü incelemeyi amaçladıkları çalışmalarında, *Vasculitis Clinical Research Consortium (VCRC) Longitudinal Studies* boyutsal çalışmasına katılan GPA, MPA, TAK ve GCA hastalarından alınan plazma örneklerinde vaskülit hastalarındaki nötrofil elastaz-DNA kompleksleri ve NET'lerin seviyelerinin sağlıklı bireylerle kıyaslandığında yüksek olduğunu ancak hastalık aktivitesiyle doğrudan

ilişkili olmadığını gösterilmiştir. NET düzeyleri, hem hastalık aktivitesi döneminde hem de remisyon sırasında artış göstermiştir. Ayrıca, vaskülit hastalarının plazmasında NET'lerin parçalanmasında bir bozulma gözlemlenmiş, fakat DNA parçalanma kapasitesinin arttığı bulunmuştur. NET'lere karşı antikorlar, özellikle GPA ve MPA hastalarında yüksek çıkarken, bu antikorlar ile NET düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. TAK hastalarında ise histonlara karşı antikor seviyeleri yüksek saptanmış, ancak bu antikorların hastalık aktivitesiyle ilişkilendirilmediği belirtilmiştir. Trombosit aktivasyonu, özellikle GPA hastalarında artmış ve trombosit agregasyonunu düzenleyen TSP-1 seviyeleri ile NET'ler arasında ilişki gözlemlenmiştir. Ayrıca, TSP-1 seviyelerinin, tromboembolik hastalık geçmişi olan GPA hastalarında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, NET'ler vaskülit hastalarında kronik düşük dereceli enflamasyon ve organ hasarı ile ilişkilendirilebilecek önemli bir faktördür, ancak NET düzeylerinin hastalık aktivitesini yansıtmak için güvenilir bir belirteç olmadığı ve NET oluşumu ve temizliği arasındaki dengenin bozulduğu anlaşılmaktadır.

Mukhopadhyay ve ark.ları [366] tarafından yapılan çalışmada, COVID-19 hastalarında yayınlanan kan transkriptom verilerinin kapsamlı ve tarafsız bir yeniden analizine yer verilmiştir. Çalışma, şiddetli COVID-19 hastalığında NETozis ile ilişkili gen setlerinin önemli ölçüde artış gösterdiğini, ancak genel "sitokin fırtınası"na dair bir kanıt olmadığını ortaya koymuştur. Şiddetli hastalıkta, kompleman ve koagülasyon yollarında önemli bir artış gözlemlenmiş ve NETozis ile solunum fonksiyonu (oksijen saturasyonu) arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. İlginç bir şekilde, şiddetli hastalıkta IL-6 gen ekspresyon düzeyinde erken bir zirve yaşanırken, hastalık başlangıcından günler geçtikçe IL-6 ekspresyonunun orta şiddetteki hastalık seviyesine yaklaştığı gözlemlenmiştir. Bulgular, IL-6'nın şiddetli COVID-19 hastalığının erken evresinde NETozisi tetikleyen bir faktör olduğunu ve bunun NETozis-koagülasyon/kompleman-solunum disfonksiyonu arasında kısır bir döngüye yol açtığını göstermektedir. Bu bulgular, şiddetli COVID-19 hastalığında anti-IL-6 ve NETozis inhibitörleri ile rasyonel tedavi zamanlamasının önemini vurgulamaktadır. Bizim çalışmamızda hastalık aktivitesiyle doğrudan ilişkili olarak NET'lerin seviyelerinin yüksek olması tedavi planı ve takibinde önemli olabileceğine dair düşüncemizi desteklemektedir.

Çalışmamızdan farklı olarak nötrofil fonksiyonlarının incelendiği Bakalovic vd. [367] tarafından yapılan çalışmada, kistik fibrozis (CF) hastalarında periferik kan nötrofil fonksiyonları ve fenotipik değişiklikler incelenmiştir. Çalışmaya 5-17 yaş arasındaki 19

CF'li çocuk ve yaşa uygun 14 sağlıklı çocuk dahil edilmiştir. İzole edilen nörofiller, yalnız başına veya farklı uyarıcılarla kültüre edilmiştir. Apoptoz, NETozis, fagositoz, reaktif oksijen türevleri (ROS) üretimi, nötrofil elastaz (NE) ve 11 sitokin üretimi gibi birçok fonksiyon değerlendirilmiştir. Ayrıca, nötrofil fonksiyonlarıyla ilgili 20 molekülün ekspresyonu akan hücre ölçer (*flowcytometry*) ile analiz edilmiştir. CF'li nörofiller, sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük apoptoz ve IL-18 üretimi göstermiş, ancak IL-8 seviyesi artmıştır. Nötrofil uyarımı sonrası bu fonksiyonlar daha da artmış, ROS üretimi ve CD11b ile IL-10 ekspresyonu yükselmiştir. NETozis, yalnızca orta-şiddetli CF'li bireylerde *Pseudomonas aeruginosa* ile uyarıldığında artmış ve bu süreç, birinci saniyede zorunlu ekspirasyon hacmi (FEV1) ile korelasyon göstermiştir. Fagositozda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, CF'li çocuklarda dolaşımdaki nötrofillerin fenotipik değişikliklerden daha az etkilendiği, ancak fonksiyonel anormalliklerin, hücrelerin enfeksiyon bölgesindeki uyarılma durumlarına bağlı olarak farklı stimülasyonlarla daha belirgin hale geldiği bulunmuştur.

Antimikrobiyal peptitlerin (AMP)'lerinin, otoimmün bozuklukları teşvik eden NET'lerdeki rollerini açıklamaya yönelik ve bizim NETozis temelli çalışmamızın patofizyolojisi ile ilgili Biswas ve ark.ları [368] tarafından yapılan çalışmada, AMP'ler bağışıklık düzenleyicisi olarak rolü incelenmiştir. AMP'ler, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olarak mikroorganizmalara karşı etki gösteren küçük oligopeptitlerdir ve antibakteriyel ile immünomodülatör aktiviteleri sayesinde tıbbi alanda büyük bir potansiyele sahiptir. AMP'ler, bağışıklık hücrelerinin farklılaşması, enflamatuvar yanıtlar, sitokin üretimi ve kemotaksis gibi birçok immünomodülatör özellik sunar. Nötrofil veya epitel hücrelerinin AMP üretimindeki anormallikler, enflamasyona yol açarak otoimmün yanıtların gelişimine sebep olabilir. Çalışmada, savunma peptitleri ve katepsinler gibi önemli memeli AMP'lerinin, otoimmün bozuklukları teşvik eden NET'lerdeki rollerine özel bir vurgu yapılmıştır. AMP'ler, kendilik DNA'sı veya RNA'sı ile kompleksleştğinde, otoantijenler olarak hareket eder ve plazmasitoid dendritik hücreler ile miyeloid dendritik hücreleri aktive ederek interferonlar ve sitokinlerin üretimine neden olur. Bu durum, otoenflamatuvar reaksiyonların bir dizi tetikleyicisi olarak çeşitli otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına yol açar. AMP'lerin farklı otoimmün hastalıklarda hem anti-enflamatuvar hem de pro-enflamatuvar özellikler gösterdiği için, AMP temelli bu kapsamda NETozis temelli tedavilerin geliştirilmesinden önce bu peptitlerin rolünün tam olarak anlaşılması gerekmektedir.

Yipp ve Kubes [369] NET'lerin mikrobiyal patojenleri yakalama ve öldürme mekanizmalarını inceleyerek konak savunmasındaki rollerini ayrıntılı bir şekilde ele almıştır. Çalışmada, NET'lerin bakterileri yakalama kapasitesi hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerle gösterilmiştir. Örneğin, karaciğer sinüzoidlerinde gerçekleştirilen intravital mikroskopi deneylerinde, *E. coli*'nin NET'ler tarafından yakalanarak sistemik dolaşıma yayılmasının önlendiği saptanmıştır. Bu yakalama sürecinin, trombositlerin TLR4 (Toll-lbenzeri reseptör 4) yoluyla nötrofillerle etkileşimi sonucunda NET oluşumunu tetiklediği ve bu etkileşimin LFA-1 integrin molekülüne bağımlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, CR1g reseptörüne sahip Kupffer hücrelerinin NET'ler olmadan da bakteri yakalayabildiği bilirse de NET'lerin varlığının toplam yakalama kapasitesini üç ilâ dört kat artırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, NEU lerin fagositoz yeteneği baskılandığında bile NET'lerin DNase veya antihiston antikorlarıyla bozulmadığı sürece bakterisidal etkinliğini sürdürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca, sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıklarda NET'lerin parçalanmasının azaldığı ve bu durumun, enflamatuvar bir yanıtı daha da artırarak hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu saptanmıştır. SLE hastalarında NET'lerin böbrek dokusunda biriktiği ve lupus nefriti gelişimini tetikleyebileceği gösterilmiştir. NET bileşenlerinin, vasküler hasara yol açabileceği ve otoantijen olarak işlev görebileceği vurgulanmıştır. Çalışma ayrıca, romatoid artrit (RA) gibi hastalıklarda NET salınımının, sitriline edilmiş otoantijenlerin dışa vurumuna yol açarak otoimmün yanıtı tetiklediğini de öne sürmektedir.

Son olarak, NET'lerin konak savunmasındaki bu kritik rollerine karşın, aynı zamanda tromboz, doku hasarı ve çoklu organ yetmezliği gibi yan etkilerinin olabileceğini de tartışmıştır. NET'lerde bulunan histonların endotelial hücrelere zarar verebileceği, trombosit aktivasyonunu tetikleyerek mikrotromboz oluşumuna katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir. NET'lerin bu çift yönlü etkileri, çalışmamız sonuçlarında olduğu gibi farklı klinik durumlarda, immünolojik savunma ve doku hasarı arasındaki dengeyi anlamak açısından önemli bir araştırma alanı sunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, AAA hastalarında farklı klinik tabloların NEU aktivasyonu ve enflamatuvar biyobelirteçler üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Araştırmada elde edilen bulgular, sistematik bir şekilde analiz edilmiştir.

- Toplam 118 katılımcının değerlendirildiği çalışmada, gerekli miktarda nötrofil izolasyonu kriterlerinin karşılanamadığı 26 kişi çalışma dışı bırakılmış, analizler 92 kişi üzerinde gerçekleştirilmiştir. AAA tanılı 92 hastanın yaş, cinsiyet, klinik özellikleri, kullanılan ilaç sayısı, NETozis, serum AAT seviyeleri ve diğer biyobelirteçleri gruplara göre incelenmiştir.
- Katılımcıların yaş dağılımında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamış, cinsiyet dağılımının dengeli olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin, farklı atak gruplarındaki çocukların yaş dağılımı incelendiğinde en fazla hasta sayısı 3-8 yaş grubunda (n:17) olup, bunun içinde de en çok hasta sayısı artrit +ateş atak grubunda (n:5) görüldü. Tüm yaş gruplarındaki hastalar içinde ise en çok hasta içeren atak grubu peritonit+ateş atak grubuydu (n:18, %30).
- Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$), bu da yaş ve cinsiyetin enflamatuvar süreçler üzerindeki etkisinin sınırlı olduğunu düşündürmektedir.
- Gruplar arasında tam kan NEU yüzdesi ve izole edilen NEU sayıları açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak aktif enflamasyon gösteren hastalarda NEU aktivasyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir.
- NET formasyonunun, atak dönemindeki AAA hastalarında anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Atak döneminde NETozis düzeylerinin, remisyon dönemi ve sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek olduğu belirlenirken, remisyon döneminde kontrole göre NETozis ortalama değeri daha düşüktür.
- Atak döneminde enflamasyon belirteçleri olan CRP, ve WBC değerlerinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu değerlerin, remisyon döneminde normale döndüğü ve kontrol grubuyla benzer seviyelerde olduğu ifade edilmiştir.
- Aktif enflamasyon grubundaki WBC, CRP, NETozis ve serum AAT değerleri, remisyon ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksektir ($p=0,000$).
- NETosis düzeyleri, aktif enflamasyon gruplarında belirgin şekilde artış göstermiştir. En yüksek NETosis düzeyi Peritonit + Plörit + Ateş grubunda saptanmıştır ($p=0,000$).

- Atak sırasında serum AAT düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla artış gösterdiği gözlemlenmiştir. En yüksek değerler Plörit grubunda gözlenmiştir. Ancak remisyon döneminde AAT seviyelerinin normale dönerek kontrol grubuyla arasında anlamlı bir fark göstermediği tespit edilmiştir. Bu bulgu, AAT'nin AAA patogenezindeki rolüne işaret etmektedir.
- Sağlıklı kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda, atak döneminde NETosis ve AAT düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu, remisyon döneminde ise bu seviyelerin kontrol grubuyla benzer olduğu görülmüştür.
- MEFV gen mutasyonları ile NET formasyonu arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Özellikle M694V mutasyonu taşıyan hastalarda NET formasyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu mutasyonların, hastalık şiddeti ve fenotipik farklılıklarda etkili olduğu vurgulanmıştır.

Araştırmanın sonuçları, AAA hastalarında atak dönemlerinde enflamasyon ve NETosis seviyelerinin arttığını, remisyon döneminde ise bu seviyelerin normale döndüğünü açıkça ortaya koymuştur. NETosis'in AAA'nın enflamatuvar mekanizmalarında önemli bir rol oynadığı, AAT'nin ise enflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde potansiyel bir etkiye sahip olabileceği öne sürülmüştür. Bu bulgular, AAA'nın patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine değerli katkılar sunmaktadır. Çalışmada, remisyon dönemi ile karşılaştırıldığında, AAA hastalarının atak dönemlerinde NETosis, WBC, CRP ve AAT seviyelerinin belirgin şekilde yükseldiği tespit edilmiştir. Özellikle “Peritonit + Plörit + Ateş” grubunda NETosis ve AAT seviyelerinin diğer gruplara kıyasla daha yüksek olması, bu kombine enflamatuvar durumların NEU aktivasyonu üzerinde daha güçlü bir etkisi olduğunu düşündürmüştür. Araştırma, AAA hastalığına sahip çocuklarda NETosis ve AAT düzeyleri arasındaki ilişkiyi ve bu biyobelirteçlerin hastalık mekanizmalarındaki rolünü aydınlatmıştır. Bulgular, enflamasyonun NEU aktivasyonu ve enflamatuvar biyobelirteçler üzerindeki etkilerini, farklı klinik tablolar açısından değerlendirme imkânı sunmuştur. Ayrıca, hastalığın aktif enflamasyon döneminde bu parametrelerin izlenmesinin önemine işaret edilmiştir. Bu sonuçlar, NETosis ve AAT'nin, AAA'nın patofizyolojisinde kritik roller üstlenebileceğini göstermiştir. Bu biyobelirteçlerin takip edilmesi, hastalığın aktif enflamasyon döneminin izlenmesinde kullanılabileceği gibi bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine de ışık tutmaktadır. Özellikle, NETosis ve AAT'yi hedef alan stratejiler, AAA hastalarının tedavi ve izlem süreçlerinde yenilikçi yaklaşımlar sunabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma, AAA hastalarında enflamasyon, NEU aktivasyonu ve biyobelirteçler arasındaki ilişkiyi kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Elde edilen veriler hem temel bilim hem de klinik uygulamalar açısından önemli katkılar sağlamış; AAA'nın patogenezinin daha iyi anlaşılmasına ve hastalar için daha etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yeni bir perspektif kazandırmıştır. AAA hastalarında enflamatuvar biyobelirteçlerin ve klinik semptomların ilişkisinin anlaşılmasına katkı sağlamıştır. Bulgular, beklenen enflamatuvar yanıtları ortaya koyarken, bazı beklenmeyen sonuçlar da dikkat çekmiştir. Özellikle, remisyon dönemindeki biyobelirteçlerin tamamen normale dönmemesi ve kombine enflamasyon gruplarında aşırı NEU aktivasyonu, hastalığın heterojen doğasını yansıtmaktadır. Bu nedenle daha geniş hasta gruplarında, genetik polimorfizmleri de içerecek çalışmalar yapılmalıdır. Subklinik enflamasyonu izlemek için daha hassas biyobelirteçlerin değerlendirilmesi gereklidir. Kombine enflamasyon gruplarında, daha agresif tedavi yaklaşımlarının etkisi araştırılmalıdır.

Çalışmanın kısıtlılıkları

Bu çalışmanın en önemli sınırlılığı, hasta sayısının sınırlı olmasıdır. Daha büyük ve çeşitli popülasyonlarda yapılacak araştırmalar, elde edilen sonuçların genellenebilirliğini artırabilir. Ayrıca, NETosis ve AAT düzeylerinin dinamik değişimini anlamak için prospektif ve uzun süreli izlem çalışmaları gereklidir. Çalışma sırasında biyobelirteç düzeylerini etkileyebilecek komorbid durumlar veya ilaç kullanımları gibi faktörlerin kontrol edilmesi, bulguların gücünü artırmak için önemli bir nokta olabilir.

Klinik öneriler

Biyobelirteçlerin kullanımı

- NEU Ekstrasellüler Tuzak (NET) seviyelerinin ölçümü, AAA'nın aktif enflamasyon dönemlerinin daha hassas bir şekilde tespiti için kullanılabilir. NETosis, özellikle karışık enflamatuvar tabloların (örn. Peritonit + Plörit + Ateş) daha iyi anlaşılmasında yardımcı olabilir.
- AAT seviyelerinin rutin takipte değerlendirilmesi, enflamasyonun derecesini ve tedaviye yanıtı izlemek için bir araç olarak kullanılabilir. AAT seviyelerindeki artışın klinik tablo ile korelasyonu, tedavi stratejilerini kişiselleştirmek için bir temel sağlayabilir.

Tedaviye yönelik yaklaşımlar

- Çalışma sonuçları, enflamatuvar belirteçlerdeki değişimlerin kolşisin dozajının değerlendirilmesine yardımcı olabileceğini göstermektedir. Özellikle NETosis'in belirgin şekilde arttığı durumlarda, kolşisin dozu optimize edilebilir veya alternatif tedaviler düşünülebilir.
- AAT seviyelerindeki değişimlerin, tedavi yanıtını modüle etme potansiyeli dikkate alınmalıdır. Gelecekte, AAT takviyesinin enflamasyonu kontrol altına almak için bir terapi seçeneği olup olmayacağı araştırılabilir.

Fenotipik çeşitliliğe dayalı yönetim

Farklı klinik tabloların biyobelirteç düzeyleri üzerindeki etkisi göz önünde bulundurularak, AAA hastalarının bireyselleştirilmiş yönetimi önerilmektedir. Örneğin hafif klinik tablolarda daha sıkı biyobelirteç takibi yerine standart tedavi protokollerinin devamı yeterli olabilir. Şiddetli veya karışık klinik tablolarda CRP, WBC, NETosis ve AAT seviyelerinin izlenmesi, enflamasyonun daha iyi yönetilmesine yardımcı olabilir.

Erken tanı ve izlem stratejileri

- NETosis ve AAT gibi biyobelirteçlerin enflamasyonun erken dönemlerinde ölçülmesi, AAA'nın erken teşhisinde ve olası komplikasyonların önlenmesinde fayda sağlayabilir.
- Özellikle kombine enflamatuvar tabloları olan hastalar için biyobelirteç seviyelerinin düzenli izlenmesi, enflamasyon aktivitesinin kontrol altında tutulması açısından önemlidir.

5. Komorbidite yönetimi

- NETosis'in artışı ve enflamatuvar süreçler, AAA'da vasküler ve organ hasarı riskini artırabilir. Bu nedenle, AAA hastalarında kardiyovasküler risk faktörlerinin (örn. hipertansiyon, dislipidemi) erken dönemde değerlendirilmesi ve yönetilmesi önerilmektedir.

6. Multidisipliner yaklaşım

- AAA'nın fenotipik çeşitliliği ve biyobelirteç profillerindeki farklılıklar göz önüne alındığında, hastaların yönetiminde romatolog, genetik uzmanı, enfeksiyon hastalıkları uzmanı ve gerektiğinde nefrolog ve gastroenterolog gibi uzmanların iş birliği önerilmektedir.

7. Hasta eğitimi

- Hastaların ve ailelerinin, biyobelirteçlerin izlenmesi ve tedaviye uyumun önemi konusunda bilgilendirilmesi, enflamasyon kontrolü açısından kritik bir rol oynar.

Bu öneriler, AAA'nın biyobelirteç temelli izlenimi ve yönetimini geliştirmek amacıyla uygulanabilir. Ancak önerilerin daha geniş hasta popülasyonları üzerinde yapılan çalışmalarla desteklenmesi ve klinik uygulamalarda doğrulanması gereklidir.

Gelecekteki çalışmalar için öneriler

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, AAA hastalarında NETosis ve AAT'nin hem tanısal hem de prognostik biyobelirteçler olarak potansiyel taşıyabileceğini göstermektedir. Gelecekte, bu biyobelirteçlerin farklı klinik tablolarla ilişkisini anlamaya yönelik daha geniş çaplı çalışmalar yapılması önerilmektedir. Ayrıca, NETosis ve AAT'yi hedef alan tedavi yaklaşımlarının etkinliği ve güvenilirliği araştırılmalıdır.

- Daha geniş katılımcı grupları ve uzun dönem izlem çalışmaları ile bu bulguların doğrulanması önerilmektedir.
- NETosis ve AAT düzeylerinin, AAA hastalarında potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanımı için ileri çalışmalar yapılmalıdır.
- Kombine enflamatuvar tabloların yönetiminde bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının değerlendirilmesi faydalı olabilir.

Literatüre katkı

Bu çalışma, AAA'da NEU aktivasyonu ve NETosis ile ilgili literatüre özgün katkılar sunmaktadır. Daha önceki çalışmalarda NETosis ve AAT arasındaki ilişki sınırlı şekilde

araştırılmıştır. Bununla birlikte, bu biyobelirteçlerin enflamasyonun aktif ve remisyon dönemlerindeki değişimlerini ortaya koymak, bu çalışmanın özgün değerlerinden biridir. Ayrıca, farklı klinik tabloların (örn. Peritonit + Plörit + Ateş) biyobelirteç düzeyleri üzerindeki etkisi, literatürde nispeten az çalışılmış bir konudur.

KAYNAKLAR

1. Samuels, J. and Özen, S. (2006). Familial Mediterranean fever and the other autoinflammatory syndromes: evaluation of the patient with recurrent fever. *Current Opinion in Rheumatology*, 18(1), 108-117.
2. Livneh, P., Langevitz, P., Zemer, D., Zaks, N., Kees, S., Lidar, T., Migdal, A., Padeh, S. and Pras, M. (1997). Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheumatism*, 40(10), 1879-1885.
3. Ben-Chetrit, E. and Levy, M. (1998). Does the lack of the P-glycoprotein efflux pump in neutrophils explain the efficacy of colchicine in familial Mediterranean fever and other inflammatory diseases?. *Medical Hypotheses*, 51(5), 377-380.
4. Ben-Chetrit, E. and Levy, M. (1998). Familial Mediterranean fever. *The Lancet*, 351(9103), 656-664.
5. Lancieri, M., Bustaffa, M., Palmeri, S., Prigione, I., Penco, F., Papa, R., Volpi, S., Caorsi, R. and Gattorno, M. (2023). An update on familial Mediterranean fever. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9584.
6. Kışla Ekinçi, R., Kilic Konte, E., Akay, N. and Gul, U. (2024). Familial Mediterranean fever in childhood. *Turkish Archives of Pediatrics*, 59(6), 527-534.
7. Siegal, S. (1945). Benign paroxysmal peritonitis. *Annals of Internal Medicine*, 23, 1-21.
8. Çobankara, V. and Balkarlı, A. (2011). Ailesel akdeniz ateşi. *Pamukkale Medical Journal*, 86-98.
9. Cattani, R. and Mamou, H. (1951). 14 cases of periodic disease, 8 of which are complicated by kidney diseases. *Bulletin of the Medical Society of the Hospital of Paris*, 67, 1104-1107.
10. Adwan, M. (2015). A brief history of familial Mediterranean fever. *Saudi Medical Journal*, 36(9), 1126-1127.
11. Heller, H., Sohar, E. and Sherf, L. (1958). Familial Mediterranean fever. *AMA Archives of Internal Medicine*, 102(1), 50-71.
12. Ben-Chetrit, E. and Touitou, I. (2009). Familial Mediterranean fever in the world. *Arthritis Care & Research*, 61(10), 1447-1453.
13. Özen, S. (2018). Update on the epidemiology and disease outcome of familial Mediterranean fever. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 32(2), 254-260.
14. Park, Y., Remmers, E., Lee, W., Ombrello, A., Chung, L., Shilei, Z., Stone, D. and Chae, J. (2020). Ancient familial Mediterranean fever mutations in human pyrin and resistance to *Yersinia pestis*. *Nature Immunology*, 21(8), 857-867.

15. Özen, S., Bilginer, Y. and Özen, S. (2014). A clinical guide to autoinflammatory diseases: familial Mediterranean fever and next-of-kin. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(3), 135.
16. Schnappauf, O., Chae, J., Kastner, D. and Aksentijevich, I. (2019). The pyrin inflammasome in health and disease. *Frontiers in Immunology*, 10, 1745.
17. Bozkurt, Y., Demir, A., Erman, B. and Gül, A. (2015). Unified modeling of familial Mediterranean fever and cryopyrin associated periodic syndromes. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 893507.
18. Manukyan, G., Petrek, M., Kriegova, E., Ghazaryan, K., Fillerova, R. and Boyajyan, A. (2013). Activated phenotype of circulating neutrophils in familial Mediterranean fever. *Immunobiology*, 218(6), 892-898.
19. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D., Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535.
20. Branzk, N. and Papayannopoulos, V. (2013). Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars in Immunopathology*, 35(4), 513-530.
21. Mitroulis, K., Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Skendros, P., Apostolidou, E., Kourtzelis, I., Drosos, G., Boumpas, D. and Ritis, K. (2011). Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*, 6(12), e29318.
22. Apostolidou, E., Skendros, P., Kambas, K., Mitroulis, I., Konstantinidis, T., Chrysanthopoulou, A., Nakos, K., Tsironidou, V., Koffa, M., Boumpas, D. and Ritis, K. (2014). Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(1), 269-277.
23. Soriano, A. and Manna, R. (2012). Familial Mediterranean fever: new phenotypes. *Autoimmunity Reviews*, 12(1), 31-37.
24. Tunca, M., Akar, S., Önen, F., Özdoğan, H., Kasapçour, Ö., Yalçinkaya, F., Tutar, E. and Çobankara, V. (2005). Familial Mediterranean fever (AAA) in Turkey: Results of a nationwide multicenter study. *Medicine*, 84(1), 1-11.
25. Gedalia, A., Adar, A. and Gorodischer, R. (1992). Familial Mediterranean fever in children. *The Journal of Rheumatology Supplement*, 35, 1-9.
26. Fonnesu, C., Cerquaglia, M., Giovinale, M., Curigliano, V., Verrecchia, E., de Socio, G., La Regina, M., Gasbarrini, G. and Manna, R. (2009). Familial Mediterranean Fever: A review for clinical management. *Joint, Bone, Spine*, 76(3), 227-233.
27. Yuval, Y., Hemo Zisser, M., Zemer, D., Sohar, E. and Pras, M. (1995). Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever (AAA). *American Journal of Medical Genetics*, 57(3), 455-457.

28. Nir-Paz, R., Ben-Chetrit, E., Pikarsky, E., Hassin, D., Hasin, Y. and Chajek-Shaul, T. (2000). Unusual presentation of familial Mediterranean fever: Role of genetic diagnosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59(10), 836-838.
29. Lee, J., Kim, J., Shim, K., Lee, J., Lee, J. and Chae, J. (2016). Familial Mediterranean fever presenting as fever of unknown origin in Korea. *Korean Journal of Pediatrics*, 59(1), 53.
30. Diri, N. (2010). *Bölgemizdeki ailevi Akdeniz ateşi tanısı ile takip edilen çocuk hastaların sonuçlarının değerlendirilmesi*. Tıpta Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erzurum, 78-82.
31. Tufan, A. and Lachmann, H. (2020). Familial Mediterranean fever, from pathogenesis to treatment: A contemporary review. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(7), 1591-1610.
32. Gürbüz, Ö. (2013). *Ailevi Akdeniz Ateşi hastalarında karotis intima-media kalınlığı ile glutatyon-s-transferaz gen polimorfizmi arasındaki ilişki*. Tıpta Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sivas, 45-52.
33. Shohat, M. and Halpern, G. (2011). Familial Mediterranean fever-a review. *Genetics in Medicine*, 13(6), 487-498.
34. Sohar, E., Gafni, J., Pras, M. and Heller, H. (1967). Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *The American Journal of Medicine*, 43(2), 227-253.
35. Taşpınar, N. (2011). *Doğu Anadolu bölgesi FMF (ailesel Akdeniz ateşi) hastalığı MEFV gen mutasyonları dağılımlarının incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 122-135.
36. Olgun, S., Akman, I., Kurt, A., Tuzun, A. and Kutluay, T. (2005). MEFV mutations in familial Mediterranean fever: Association of M694V homozygosity with arthritis. *Rheumatology International*, 25(4), 255-259.
37. Tamir, N., Langevitz, P., Zemer, D., Pras, E., Shinar, Y., Padeh, S., Zaks, N., Pras, M. and Livneh, A. (1999). Late-onset familial Mediterranean fever (FMF): A subset with distinct clinical, demographic, and molecular genetic characteristics. *Journal of Medical Genetics*, 87(1), 30-35.
38. Özdoğan, H., Arısoy, N., Kasapçapur, Ö., Sever, L., Çalışkan, S., Tüzüner, N., Mat, C. and Yazıcı, H. (1997). Vasculitis in familial Mediterranean fever. *The Journal of Rheumatology*, 24(2), 323-327.
39. Özdoğan, H. and Kasapçapur, Ö. (2006). Ailesel akdeniz ateşi. *Dirim*, 81(2), 197-205.
40. Eshel, G. (1988). Acute orchitis in familial Mediterranean fever. *Annals of Internal Medicine*, 109(2), 164.
41. Langevitz, P., Zemer, D., Livneh, A., Shemer, J. and Pras, M. (1994). Protracted febrile myalgia in patients with familial Mediterranean fever. *The Journal of Rheumatology*, 21(9), 1708-1709.

42. Öztürk, A. (2009). *Tek taraflı mutasyon taşıyan Türk FMF hastalarında MEFV gen mutasyonlarının taranması*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 22-36.
43. Bayram, M., Çankaya, T., Bora, E., Kavukçu, S., Ülgenalp, A., Soylu, A. and Türkmen, M. (2015). Risk factors for subclinical inflammation in children with familial Mediterranean fever. *Rheumatology International*, 35(8), 1393-1398.
44. Eshed, Y., Rosman, A., Livneh, A., Kedem, R., Langevitz, P., Ben-Zvi, I. and Lidar, M. (2014). Exertional leg pain in familial Mediterranean fever: A manifestation of an underlying enthesopathy and a marker of more severe disease. *Arthritis & Rheumatology*, 66(11), 3221-3226.
45. Brik, R., Shinawi, M., Kasinetz, L. and Gershoni-Baruch, R. (2001). The musculoskeletal manifestations of familial Mediterranean fever in children genetically diagnosed with the disease. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 44(6), 1416-1419.
46. Mercan, R., Turan, A., Bitik, B., Tufan, A., Haznedaroğlu, İ. and Göker, B. (2016). Rapid resolution of protracted febrile myalgia syndrome with anakinra: Report of two cases. *Modern Rheumatology*, 26(3), 458-459.
47. Kasapçopur, Ö. and Arısoy, N. (2006). Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer otoenflamatuvar hastalıklar Derleme. *Türk Pediatri Arşivi*, 41(1), 9-17.
48. Bektaş, C., Tufan, A., Çetin, N., Yazar, C. and Carman, K. (2022). Neurological face of familial Mediterranean fever. *Turkish Archives of Pediatrics*, 57(5), 511-515.
49. Ehrenfeld, M., Levy, M., Eliakim, M. and Brzezinski, A. (1987). Fertility and obstetric history in patients with familial Mediterranean fever on long-term colchicine therapy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 94(12), 1186-1191.
50. Rabinovitch, O., Zemer, D., Kukia, E., Sohar, E. and Mashiach, S. (1992). Colchicine treatment in conception and pregnancy: Two hundred thirty-one pregnancies in patients with familial Mediterranean fever. *American Journal of Reproductive Immunology*, 28(3-4), 245-246.
51. Bitar, E., Rizk, A., Nasr, W., Gédéon, E. and Tabbara, W. (1985). Familial paroxysmal polyserositis. Previously unpublished peritoneal complications. A case. *Presse Medicale* (Paris, France: 1983), 14(10), 586-588.
52. Stojanovic, V., Hentgen, S., Fellahi, S., Georgin-Lavialle, S., Amselem, S., Grateau, G., Bastrad, J. and Steichen, O. (2017). Concordance between CRP and SAA in familial Mediterranean fever during attack-free period: A study of 218 patients. *Clinical Biochemistry*, 50(4-5), 206-209.
53. Vinceneux, P. and Pouchot, J. (2005). Familial Mediterranean fever, clinical and laboratory findings. *Presse Medicale*, 34(13), 938-946.

54. Berkun, Y., Padeh, S., Reichman, B., Zaks, N., Rabinovich, E., Lidar, M., Shainberg, B. and Livneh, A. (2007). A single testing of serum amyloid A levels as a tool for diagnosis and treatment dilemmas in familial Mediterranean fever. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 37(3), 182-188.
55. Peleg, H. and Ben-Chetrit, E. (2013). The kidney in familial Mediterranean fever. *Journal of Rheumatology*, 40(12), 1948-1950.
56. Sarrauste de Menthier, C., Terriere, S., Pugnere, D., Ruiz, M., Demaille, J. and Touitou, I. (2003). INFEVERS: The registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 282-285.
57. Shinar, Y., Obici, L., Aksentijevich, I., Bennetts, B., Austruo, F., Ceccherini, I., Costa, J. and Touitou, I. (2012). Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(10), 1599-1605.
58. Kirnaz, B., Gezgin, Y. and Berdeli, A. (2022). MEFV gene allele frequency and genotype distribution in 3230 patients' analyses by next generation sequencing methods. *Gene*, 827, 146447.
59. Touitou, I. (2001). The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics*, 9(7), 473-483.
60. Papa, R., Doglio, M., Lachmann, H., Özen, S., Frenkel, J., Simon, A., Neven, B. and Gattorno, M. (2017). A web-based collection of genotype-phenotype associations in hereditary recurrent fevers from the Eurofever registry. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1), 167.
61. Alghamdi, M. (2017). Familial Mediterranean fever: Review of the literature. *Clinical Rheumatology*, 36(8), 1707-1713.
62. Dundar, M., Fahrioglu, U., Yıldız, S., Bakır-Güngör, B., Temel, S., Akın, H., Artan, S. and Erdem, L. (2022). Clinical and molecular evaluation of MEFV gene variants in the Turkish population: A study by the National Genetics Consortium. *Functional & Integrative Genomics*, 22(3), 291-315.
63. Booty, M., Chae, J., Masters, S., Remmers, E., Barham, B., Le, J., Barron, K., Holland, S., Kastner, D. and Aksentijevich, I. (2009). Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: Where is the second hit? *Arthritis & Rheumatism*, 60(6), 1851-1861.
64. Booth, D., Gillmore, J., Lachmann, H., Booth, S., Bybee, A., Soytürk, M., Akar, S., Pepys, M., Tunca, M. and Hawkins, P. (2000). The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM*, 93(4), 217-221.
65. Aldea, J., Campistol, J., Arostegui, J., Rius, J., Maso, M., Vives, J. and Yagüe, J. (2004). A severe autosomal-dominant periodic inflammatory disorder with renal AA amyloidosis and colchicine resistance associated to the MEFV H478Y variant in a Spanish kindred: An unusual familial Mediterranean fever phenotype or another MEFV-associated periodic. *American Journal of Medical Genetics A*, 124(1), 67-73.

66. Gangemi, S., Manti, S., Procopio, V., Casciaro, M., Di Salvo, E., Cutrupi, M., Ganci, G., Salpietro, C., Chimenz, R. and Cuppari, C. (2018). Lack of clear and univocal genotype-phenotype correlation in familial Mediterranean fever patients: A systematic review. *Clinical Genetics*, 94(1), 81-94.
67. Yılmaz, E., Dinçel, N., Sözeri, B., Özdemir, K., Bulut, I., Berdeli, A. and Mir, M. (2015). Familial Mediterranean fever in children from the Aegean region of Turkey: Gene mutation frequencies and phenotype-genotype correlation. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(6), 1198-1206.
68. Yılmaz, S., Çınar, M., Şimşek, I., Erdem, H. and Pay, S. (2015). Tocilizumab in the treatment of patients with AA amyloidosis secondary to familial Mediterranean fever. *Rheumatology (Oxford)*, 54(3), 564-565.
69. Jarjour, R. and Dodaki, R. (2011). Arthritis patterns in familial Mediterranean fever patients and association with M694V mutation. *Molecular Biology Reports*, 38, 2033-2036.
70. Wilson, M., Abou-Elalla, A., Zakaria, M., Marzouk, H., Fayed, H. and Hanna, M. (2016). Serum amyloid A type 1 gene polymorphism in Egyptian children with familial Mediterranean fever. *Pathobiology*, 83(6), 295-300.
71. Yalçinkaya, F., Akar, N. and Mısırlıoğlu, M. (1998). Familial Mediterranean fever—amyloidosis and the Val726Ala mutation. *The New England Journal of Medicine*, 338(14), 993-994.
72. Gkretsi, V., Deltas, C., Yapijakis, C. and Lamnissou, K. (2009). Screening for Familial Mediterranean Fever M694V and V726A mutations in the Greek population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(3), 291-293.
73. Gunesacar, R., Çelik, M., Arıca, V., Elmacıoğlu, S. and Öztürk, O. (2014). Frequency of MEFV gene mutations in Hatay province, Mediterranean region of Turkey and report of a novel missense mutation (I247V). *Gene*, 546(2), 195-199.
74. Kılıç, M., Varkal, M., Durmuş, M., Yıldız, I., Yıldırım, Z., Turunç, G., Oğuz, F. and Ünüvar, E. (2015). Relationship between clinical findings and genetic mutations in patients with familial Mediterranean fever. *Pediatric Rheumatology Online Journal*, 13, 59.
75. Livneh, P., Langevitz, P., Shinar, Y., Zaks, N., Kastner, D., Pras, M. and Pras, E. (1999). MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid*, 6(1), 1-6.
76. Bernot, C., da Silva, J., Petit, C., Cruaud, C., Caloustian, C., Castet, V., Ahmed-Arab, M., Dross, C., Dupont, M. and Touitou, I. (1998). Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Human Molecular Genetics*, 7(8), 1317-1325.
77. Giaglis, S., Papadopoulos, V., Kambas, K., Doulas, M., Tsironidou, V., Rafail, S., Kartalis, G., Speletas, M. and Ritis, K. (2007). MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clinical Genetics*, 71(5), 458-467.

78. Zadeh, N., Getzug, T. and Grody, W. (2011). Diagnosis and management of familial Mediterranean fever: Integrating medical genetics in a dedicated interdisciplinary clinic. *Genetics in Medicine*, 13(3), 263-269.
79. Shohat, M. (2016). Familial Mediterranean Fever. Synonym: Recurrent Polyserositis. In *GeneReviews*, Seattle, University of Washington, 1993-2024.
80. Yalçinkaya, F., Özen, S., Özçakar, Z., Aktay, N., Çakar, N., Düzova, A., Kasapçopur, O. and Bakkaloğlu, A. (2009). A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology (Oxford)*, 48(4), 395-398.
81. Ünüvar, E. (2010). Çocuklarda periyodik ateş sendromları. *ANKEM Dergisi*, 24(2), 164-167.
82. Kastner, D. (2005). Hereditary periodic fever syndromes. *Hematology*, 2005(1), 74-81.
83. Akyol Önder, E. and Ertan, P. (2020). Ailesel Akdeniz Ateşi. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(3), 413-417.
84. Kucuk, I., Gezer, R., Uçar, R. and Karahan, A. (2014). Familial Mediterranean fever. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 57(3), 97-104.
85. Balcı-Peynircioğlu, Ü., Kaya-Akça, Ü., Arıcı, Z., Avcı, E., Akkaya-Ulum, Z., Karadağ, Ö., Kalyoncu, U., Bilginer, Y., Yılmaz, E. and Özen, S. (2020). Comorbidities in familial Mediterranean fever: Analysis of 2000 genetically confirmed patients. *Rheumatology*, 59(6), 1372-1380.
86. Giese, A., Örnek, E., Kılıç, L., Kuruçay, M., Şendur, S., Lainka, E. and Henning, B. (2013). Disease severity in adult patients of Turkish ancestry with familial Mediterranean fever living in Germany or Turkey. Does the country of residence affect the course of the disease? *Journal of Clinical Rheumatology*, 19(5), 246-251.
87. Mukhin, N., Kozlovskaya, L., Bogdanova, M., Rameev, V., Moiseev, S. and Simonyan, A. (2015). Predictors of AA amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Rheumatology International*, 35(7), 1257-1261.
88. Ben-Chetrit, E. (2003). Familial Mediterranean fever (FMF) and renal AA amyloidosis--phenotype-genotype correlation, treatment and prognosis. *Journal of Nephrology*, 16(3), 431-434.
89. Saatçi, U., Özen, S., Özdemir, S., Bakkaloğlu, A., Beşbaş, N., Topaloğlu, R. and Arslan, S. (1997). Familial Mediterranean fever in children: Report of a large series and discussion of the risk and prognostic factors of amyloidosis. *European Journal of Pediatrics*, 156(8), 619-623.
90. Kalkan, G., Demirkaya, E., Açikel, C., Polat, A., Peru, H., Karaoğlu, A., Sarı, E., Dursun, I., Gök, F. and Özen, S. (2012). Evaluation of the current disease severity scores in pediatric FMF: Is it necessary to develop a new one? *Rheumatology (Oxford)*, 51(4), 743-748.

91. Özdemir, F., Gülez, N. and Makay, B. (2021). Evaluation of the international severity score for FMF (ISSF) scores in Turkish children diagnosed with FMF: A single-center experience. *Clinical Rheumatology*, 40(8), 3219-3225.
92. Píram, M., Koné-Paut, I., Lachmann, H. J., Frenkel, J., Ozen, S., Kuemmerle-Deschner, J. and Ruperto, N. (2014). Validation of the auto-inflammatory diseases activity index (AIDAI) for hereditary recurrent fever syndromes. *Annals of The Rheumatic Diseases*, 73(12), 2168-2173.
93. Goldfinger, S. (1972). Colchicine for familial Mediterranean fever. *The New England Journal of Medicine*, 287(25), 1302.
94. Taşkıran, E., Çetinkaya, A., Balcı Peynirciolu, B., Akkaya, Y. and Yılmaz, E. (2012). The effect of colchicine on pyrin and pyrin interacting proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(11), 3536-3546.
95. Slobodnick, B., Shah, S., Krasnokutsky, S. and Pillinger, M. (2018). Update on colchicine, 2017. *Rheumatology (Oxford)*, 57(1), 4-11.
96. Niel, E. and Scherrmann, J. (2006). Colchicine today. *Joint Bone Spine*, 73(6), 672-678.
97. Solak, Y., Sırıopol, D., Yıldız, A., Yılmaz, M., Ortiz, A., Covic, A. and Kanbay, M. (2017). Colchicine in renal medicine: New virtues of an ancient friend. *Blood Purification*, 43(1-3), 125-135.
98. Özen, S., Kone Paut, I. and Gül, A. (2017). Colchicine resistance and intolerance in familial Mediterranean fever: Definition, causes, and alternative treatments. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 119(2), 474-483.
99. Putterman, E., Ben-Chetrit, Y., Caraco, Y. and Levy, M. (1991). Colchicine intoxication: Clinical pharmacology, risk factors, features, and management. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 21(3), 143-155.
100. Küncl, R. and Duncan, G. (1988). Chronic human colchicine myopathy and neuropathy. *Archives of Neurology*, 45(3), 245-246.
101. Kallinich, T. D., Niehues, T., Huss, K., Lainka, E., Neudorf, U., Schaefer, C., Stojanov, S., Timmaann, C., Keitzer, R., Özdoğan, H. and Özen, S. (2007). Colchicine use in children and adolescents with familial Mediterranean fever: Literature review and consensus statement. *Pediatrics*, 119(2), 474-483.
102. Özen, S., Demirkaya, E., Erer, B., Livneh, A., Ben-Chetrit, E., Giancane, G., Özdoğan, H., Abu, I. and Carmona, L. (2016). EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(4), 644-651.
103. Diav-Citrin, O., Shechtman, S., Schwartz, V., Avgil-Tsadok, M., Finkel-Pekarsky, V., Wajnberg, R., Arnon, J., Berkovitch, M. and Ornoy, A. (2010). Pregnancy outcome after in utero exposure to colchicine. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(2), 1-6.

104. Ben-Chetrit, E., Ben-Chetrit, A., Berkun, Y. and Ben-Chetrit, E. (2010). Pregnancy outcomes in women with familial Mediterranean fever receiving colchicine: Is amniocentesis justified? *Arthritis Care & Research (Hoboken)*, 62(2), 143-148.
105. Sarı, O. (2013). Birinci basamakta ailevi Akdeniz ateşine genel yaklaşım. *Konuralp Medical Journal*, 5(2), 75-80.
106. Livneh, P., Zemer, D., Siegal, B., Laor, A., Sohar, E. and Pras, M. (1992). Colchicine prevents kidney transplant amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Nephron*, 60(4), 418-422.
107. Keven, K., Şengül, S., Kutlay, S., Ekmekçi, Y., Anadol, E., Nergizoğlu, G., Ateş, K., Ertürk, S. and Erbay, B. (2004). Long-term outcome of renal transplantation in patients with familial Mediterranean fever amyloidosis: A single-center experience. *Transplantation Proceedings*, 36(9), 2632-2634.
108. Özen, S., Sağ, E., Ben-Chetrit, E., Gattorno, M., Gül, A., Hashkes, P., Kone Paun, I. and Kuemmerle-Deschner, J. (2021). Defining colchicine resistance/intolerance in patients with familial Mediterranean fever: A modified-Delphi consensus approach. *Rheumatology (Oxford)*, 60(8), 3799-3808.
109. Bustaffa, M., Mazza, F., Sutera, D., Carabba, M., Alessio, M., Cantarini, L., Obici, L. and Gallizzi, R. (2021). Persistence of disease flares is associated with an inadequate colchicine dose in familial Mediterranean fever: A national multicenter longitudinal study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(8), 3218-3220.
110. Bhatt, H. and Cascella, M. (2024). Familial mediterranean fever. In *StatPearls*. New York: CRC Press, 45-52.
111. Terreri, M., Bernardo, W., Len, C., da Silva, C., de Magalhães, C., Sacchetti, S., Ferriani, V., Piotto, D. and Magalhães, C. (2016). Guidelines for the management and treatment of periodic fever syndromes familial Mediterranean fever. *Revista Brasileira de Reumatologia - English Edition*, 56(1), 37-43.
112. Ter Haar, N., Lachmann, H., Özen, S., Woo, P., Uziel, Y., Modesto, C., Kone Paut, I. and Frenkel, J. (2013). Paediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO) and the Eurofever/Eurotraps Projects. Treatment of autoinflammatory diseases: Results from the Eurofever Registry and a literature review. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(5), 678-685.
113. Ben-Zvi, O., Kukuy, E., Giat, E., Pras, E., Feld, O., Kivity, S., Perski, O., Bornstein, G. and Livneh, A. (2017). Anakinra for colchicine-resistant familial Mediterranean fever: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatology*, 69(4), 854-862.
114. Sevillano, E., Hernandez, E., Gonzalez, E., Mateo, I., Gutierrez, E., Morales, E. and Praga, M. (2016). Anakinra induces complete remission of nephrotic syndrome in a patient with familial Mediterranean fever and amyloidosis. *Nefrologia*, 36(1), 63-66.
115. Alpaya, N., Sumnu, A., Çalışkan, Y., Yazıcı, H., Türkmen, A. and Gül, A. (2012). Efficacy of anakinra treatment in a patient with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Rheumatology International*, 32(10), 3277-3279.

116. El Hasbani, G., Jawad, A. and Uthman, I. (2019). Update on the management of colchicine-resistant Familial Mediterranean Fever (FMF). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 1-12.
117. Çetin, P., Sarı, I., Sözeri, B., Cam, O., Birlik, M., Akkoç, N., Önen, F. and Akar, S. (2015). Efficacy of interleukin-1 targeting treatments in patients with familial Mediterranean fever. *Inflammation*, 38(1), 27-31.
118. de Benedetti, F., Gattorno, M., Anton, J., Ben-Chetrit, E., Frenkel, J., Hoffman, H., Kone Paut, I. and Junge, G. (2018). Canakinumab for the treatment of autoinflammatory recurrent fever syndromes. *New England Journal of Medicine*, 378(20), 1908-1919.
119. Koga, T., Migita, K., Sato, S., Umeda, M., Nonaka, F., Kawashiri, S., Iwamoto, N. and Kawakami, A. (2016). Multiple serum cytokine profiling to identify combinational diagnostic biomarkers in attacks of familial Mediterranean fever. *Medicine (Baltimore)*, 95(13), 3449.
120. Milledge, P., Shaw, A., Mansour, A., Williamson, S., Bennetts, B., Roscioli, T., Curtin, J. and Christodoulou, J. (2002). Allogeneic bone marrow transplantation: Cure for familial Mediterranean fever. *Blood*, 100(3), 774-777.
121. Twig, G., Livneh, A., Vivante, A., Afek, A., Shamiss, A., Derazne, E., Tzur, D., Den Zvi, I., Tirosh, A., Barchana, M., Shohat, T., Golan, E. and Amital, H. (2014). Mortality risk factors associated with familial Mediterranean fever among a cohort of 1.25 million adolescents. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(4), 704-709.
122. Sönmez, H., Sönmez, M., Çakan, M., Yavuz, M., Keskindemirci, G. and Aktay Ayaz, N. (2020). The evaluation of anxiety, depression, and quality of life scores of children and adolescents with familial Mediterranean fever. *Rheumatology International*, 40(5), 757-763.
123. Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L., Nombela Arrieta, C., Chevre, R., Gonzalez, N., Kunisaki, Y. and Hidalgo, A. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*, 153(5), 1025-1035.
124. Boxio, R., Bossenmeyer-Pourié, C., Steinckwich, N., Dournon, C. and Nübe, O. (2004). Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(4), 604-611.
125. Treuting, P., Dintzis, S. and Montine, K. (2017). *Comparative Anatomy and Histology*. New York: Academic Press, 65-72.
126. Bekkering, S. and Torensma, R. (2013). Another look at the life of a neutrophil. *World Journal of Hematology*, 2(2), 44-58.
127. Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9, 113.
128. Kubes, P. (2018). The enigmatic neutrophil: What we do not know. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 399-406.

129. Ley, K., Hoffman, P., Kubes, P., Cassatella, M., Zychlinsky, A., Hedrick, C. and Catz, S. (2018). Neutrophils: New insights and open questions. *Science Immunology*, 3(30), 4579.
130. Basu, S., Hodgson, G., Katz, M. and Dunn, A. (2002). Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*, 100(3), 854-861.
131. Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L., de Boer, R., Borghans, J., Tesselaar, K. and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116(4), 625-627.
132. Hidalgo, M., Caretta, P., Alarcon, P., Manosalva, C., Müller, A., Navarro, M., Hidalgo, T., Kaehne, A., Taubert, A., Hermosilla, C. and Burgos, R. (2019). Pro-inflammatory mediators and neutrophils are increased in synovial fluid from heifers with acute ruminal acidosis. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 225.
133. Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), 173-182.
134. Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, 198(5), 773-783.
135. Aulik, N., Hellenbrand, K. and Czuprynski, C. (2012). Mannheimia haemolytica and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infection and Immunity*, 80(5), 1923-1933.
136. Dworski, R., Simon, H., Hoskins, A. and Yousefi, S. (2011). Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(5), 1260-1266.
137. Morshed, R., Hlushchuk, D., Simon, A., Walls, K., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H. and Yousefi, S. (2014). NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *Journal of Immunology*, 192(11), 5314-5323.
138. Granger, V., Faille, D., Marani, V., Noël, B., Gallais, Y., Szely, N., Flament, H., Pallardy, M., Chollet-Martin, S. and de Chaisemartin, L. (2017). Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *Journal of Leukocyte Biology*, 102(3), 775-781.
139. Möllerherm, H., von Köckritz-Blickwede, M. and Branitzki-Heinemann, K. (2016). Antimicrobial activity of mast cells: Role and relevance of extracellular DNA traps. *Frontiers in Immunology*, 7, 265.
140. Faurschou, M. and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5(14), 1317-1327.
141. Sheshachalam, N., Srivastava, S., Mitchell, T., Lacy, P. and Eitzen, G. (2014). Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 5, 448.

142. Remijnsen, Q., Kuijpers, T., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P. and Vanden Berghe, T. (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial. *Cell Death & Differentiation*, 18(4), 581-588.
143. Urban, C., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W. and Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000639.
144. Amulic, B. and Hayes, G. (2011). Neutrophil extracellular traps. *Current Biology*, 21(9), 297-298.
145. Sönmez, H., Sönmez, M., Çakan, M., Yavuz, M., Keskindemirci, G. and Aktay Ayaz, N. (2020). The evaluation of anxiety, depression, and quality of life scores of children and adolescents with familial Mediterranean fever. *Rheumatology International*, 40(5), 757-763.
146. Fuchs, T., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), 231-241.
147. Vorobjeva, N. and Pinegin, B. (2014). Neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Moscow)*, 79(12), 1286-1296.
148. Jorch, S. and Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine*, 23, 279-287.
149. Papayannopoulos, V. and Zychlinsky, A. (2009). NETs: A new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*, 30(11), 513-521.
150. Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y., Perlin, J., Leonelli, L. and Coonrod, S. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and. *The Journal of Cell Biology*, 184(2), 205-213.
151. Karlsson, A. and Dahlgren, C. (2002). Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(1), 49-60.
152. Li, M., Li, M., Lindberg, M., Kennett, M., Xiong, N. and Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1853-1862.
153. Palmer, P., Cooper, M., Ling, H., Wright, A., Huissoon, A. and Chapple, I. (2012). Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clinical and Experimental Immunology*, 167(2), 261-268.
154. van den Berg, E., van Koppen, A., Ahlin, A., Belohradsky, B., Bernatowska, E., Corbeel, L. and Kuijpers, T. (2009). Chronic granulomatous disease: The European experience. *PLoS One*, 4(4), e5234.
155. Miller, R., Abrams, A., Dorfman, A. and Klein, M. (1942). Antibacterial properties of protamine and histone. *Science*, 96(2497), 428-430.

156. Sørensen, O. and Borregaard, N. (2016). Neutrophil extracellular traps—the dark side of neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(5), 1612-1620.
157. Young, K., Malcolm, J., Kret, S., Caceres, K., Poch, K., Nichols, D. and Nick, J. (2011). Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One*, 6(9), e23637.
158. Scharrig, A., Carestia, M., Ferrer, M., Cédola, M., Pretre, G., Drut, R., Picardeau, M., Schattner, M. and Gómez, R. (2015). Neutrophil extracellular traps are involved in the innate immune response to infection with *Leptospira*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), e0003927.
159. Savchenko, K., Martinod, K., Seidman, S., Wong, S., Borissoff, G., Piazza, G., Libby, P. and Wagner, D. (2014). Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(6), 860-870.
160. Dwivedi, I., Neeli, I., Schall, N., Wan, H., Desiderio, D., Csernok, E., Thompson, P. and Radic, M. (2014). Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity. *FASEB Journal*, 28(7), 2840-2851.
161. Liu, P., Yang, M., Shi, Y., Zhang, M., Yao, M., Liu, Y. and Zhang, X. (2019). NLRP3 activation induced by neutrophil extracellular traps sustains inflammatory response in the diabetic wound. *Clinical Science (London)*, 133(4), 565-582.
162. Walker, T., Tomlin, K., Worthen, G., Poch, K., Lieber, J., Saavedra, M. and Nick, J. (2005). Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infection and Immunity*, 73(6), 3693-3701.
163. Molnár, A., Jakus, Z. and Ledó, N. (2023). NETosis: An emerging therapeutic target in renal diseases. *Frontiers in Immunology*, 14, 1253667.
164. Kaplan, M. and Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: Double-edged swords of innate immunity. *Journal of Immunology*, 189, 2689-2695.
165. Manda, M., Pruchniak, M., Arazna, M. and Demkow, U. (2014). Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Central European Journal of Immunology*, 39, 116-121.
166. Yousefi, J., Gold, N., Andina, J., Lee, J., Kelly, A., Kozłowski, E. and Simon, H. (2008). Catapultlike release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature Medicine*, 14, 949-953.
167. Lin, C., Rubin, R., Khandpur, J., Wang, M., Riblett, S., Yalavarthi, S., Villanueva, E. and Bruce, A. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *Journal of Immunology*, 187(1), 490-500.
168. Yıldız, S. (2016). Netosis: Alternative defense method used by neutrophils to fight pathogens. *Acta Parasitologica Turcica*, 40, 158-162.

169. Branzk, A., Lubojemska, S., Hardison, Q., Wang, M., Gutierrez, G., Brown, V. and Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, 15(11), 1017-1025.
170. Manfredi, G., Ramirez, P., Rovere-Querini, G. and Maugeri, N. (2018). The neutrophil's choice: Phagocytosis vs make neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology*, 9, 288.
171. Sollberger, D., Tilley, D. and Zychlinsky, A. (2018). Neutrophil extracellular traps: The biology of chromatin externalization. *Developmental Cell*, 44(12), 542-553.
172. Guimaraes-Costa, M., Nascimento, M., Wardini, A., Pinto-da-Silva, L. and Saraiva, E. (2012). ETosis: A microbicidal mechanism beyond cell death. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 929743.
173. Díaz-Godínez, C. and Carrero, J. (2019). The state of art of neutrophil extracellular traps in protozoan and helminthic infections. *Bioscience Reports*, 39(11), 0916.
174. Meissner, R., Seger, D., Moshous, D., Fischer, A., Reichenbach, J. and Zychlinsky, A. (2010). Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood*, 116(9), 1570-1573.
175. Farley, J., Stolley, P., Zhao, P., Cooley, J. and Remold-O'Donnell, E. (2012). A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation. *Journal of Immunology*, 189(9), 4574-4581.
176. Maueröder, A., Mahajan, S., Paulus, S., Gößwein, S., Hahn, J., Kienhöfer, D. and Leppkes, M. (2016). The ratio of bicarbonate to CO₂ and the pH regulate the capacity of neutrophils to form NETs. *Frontiers in Immunology*, 7, 583.
177. Papayannopoulos, V., Metzler, K., Hakkim, A. and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(1), 677-691.
178. Vorobjeva, N. and Chernyak, B. (2020). NETosis: Molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Moscow)*, 85(10), 1178-1190.
179. Huang, J., Hong, W., Wan, M. and Zheng, L. (2022). Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. *MedComm*, 3(19), 162.
180. de Bont, W., Boelens, J. and Pruijn, G. (2018). NETosis, complement, and coagulation: A triangular relationship. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(1), 19-27.
181. Alasmari, A. (2020). In vivo imaging of neutrophil extracellular traps (NETs): Visualization methods and outcomes. *BioMed Research International*, 4192745.
182. Yipp, B., Petri, D., Salina, D., Jenne, C., Scott, B., Zbytnuik, L. and Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, 18, 1386-1393.

183. Munoz-Caro, I., Conejeros, E., Zhou, E., Pikhovych, A., Gartner, U., Hermosilla, C., Kulke, D. and Taubert, A. (2018). *Dirofilaria immitis* microfilariae and third-stage larvae induce canine NETosis resulting in different types of neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology*, 9, 968.
184. Omar, A. and Abdelal, H. (2023). NETosis in parasitic infections: A puzzle that remains. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 8975.
185. Young, K. (1995). An overview of human brucellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 21(2), 283-289.
186. Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S. and Radic, M. (2009). Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *Journal of Innate Immunity*, 1(3), 194-201.
187. Woolcott, M. and Islam, M. (2014). Arachidonic acid activates release of calcium ions from reticulum via ryanodine receptor channels in C2C12 skeletal myotubes. *Biochemistry (Moscow)*, 79(8), 845-846.
188. Cowland, J. and Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. In *Immunology Reviews*, 273(1), 11-28.
189. Brubaker, S., Bonham, K., Zanoni, I. and Kagan, J. (2015). Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annual Review of Immunology*, 33, 257-290.
190. Simone, M. and Sarode, R. (2017). Rossi's principles of transfusion medicine. In *Transfusion*, 265.
191. Soehnlein, O. and Swirski, F. (2013). Hypercholesterolemia links hematopoiesis with atherosclerosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(3), 129-136.
192. Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H. and Köhler, G. (1994). *Nature*, 368(6469), 339-342.
193. Stanley, E. R., Lieschke, G. J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J., Maher, D. and Dunn, A. (1994). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5592.
194. Nishinakamura, R., Miyajima, A., Mee, P., Tybulewicz, V. and Murray, R. (1996). Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 function. *Blood*, 88(7), 2458-2464.
195. Stark, M., Huo, Y., Burcin, T., Morris, M., Olson, T. and Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22(3), 285-294.
196. Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M. and Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 31(8), 318-324.

197. Val, S., Poley, M., Brown, K., Choi, R., Jeong, S., Colberg-Poley, A. and Preciado, D. (2016). Proteomic characterization of middle ear fluid confirms neutrophil extracellular traps as a predominant innate immune response in chronic otitis media. *PLoS One*, 11(4), e0152865.
198. Beiter, K., Wartha, F., Albiges, B., Normark, S., Zychlinsky, A. and Henriques-Normark, B. (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from. *Current Biology*, 16(4), 401-407.
199. Shak, H., Ludewick, K., Howery, F., Sakai, F., Yi, H., Harvey, R., Paton, J., Klugman, K. and Vidal, J. (2013). Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *mBio*, 4(5), 655.
- 200.
201. Hall, D. and Mah, T. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276-301.
202. Baker, A., Imade, G., Molta, N., Tawde, P., Pam, S., Obadofin, M. and Keller, T. III. (2008). Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar*, 7, 41.
203. Abi Abdallah, C., Lin, C., Ball, C., King, M., Duhamel, G. and Denkers, E. (2012). *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infection and Immunity*, 80(2), 768-777.
204. Munoz Caro, T., Hemosilla, C., Silva, L., Cortes, H. and Taubert, A. (2014). Neutrophil extracellular traps as innate immune reaction against the emerging apicomplexan parasite *Besnoitia besnoiti*. *PLoS One*, 9(3), e91415.
205. Karakurt, K. and Yıldız, K. (2020). In vitro investigation of NETosis reaction developing from dog polymorphonuclear neutrophils to *Toxoplasma gondii*. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 44, 886-893.
206. Yıldız, S., Gökpınar, A., Gazyağcı, A., Babur, C., Sursal, N. and Azkur, A. (2017). Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 189, 1-10.
207. Behrendt, J., Ruiz, A., Zahner, H., Taubert, A. and Hermosilla, C. (2010). Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(1), 1-8.
208. El-Naccache, D., Chen, F., Chen, N. and Gause, W. (2020). The NET effect of neutrophils during helminth infection. *Cell Host Microbe*, 27(2), 165-168.
209. Chuah, M., Jones, M., Burke, D., McManus, D., Owen, H. and Gobert, G. (2014). Defining a pro-inflammatory neutrophil phenotype in response to schistosome eggs. *Cellular Microbiology*, 16, 11666-1677.

210. Bonne-Annee, S., Kerepesi, L., Hess, J., Wesolowski, J., Paumet, F., Lok, J., Nolan, T. and Abraham, D. (2014). Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval *Strongyloides stercoralis*. *Microbes and Infection*, 16(7), 502-511.
211. McCoy, B., Reaves, S., Giguere, R., Coates, B., Rada, B. and Wolstenholme, A. (2017). Human leukocytes kill *Brugia malayi* microfilariae independently of DNA-based extracellular trap release. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), e5279.
212. Guo, L., Wang, X., Meng, S., Zhang, Z., Sheng, Z., Wei, Z., Luo, X. and Cai, X. (2020). Newly excysted juveniles of *Fasciola gigantica* trigger the release of water buffalo neutrophil extracellular traps in vitro. *Experimental Parasitology*, 211, 107828.
213. Ehrens, N., Rüdiger, L., Heepmann, L., Linnemann, L., Hartmann, W., Hübner, M. and Breloer, M. (2021). Eosinophils and neutrophils eliminate migrating *Strongyloides ratti* larvae at the site of infection in the context of extracellular DNA trap formation. *Frontiers in Immunology*, 12, 715766.
214. Peixoto, R., Silva, L., Lopez-Osorio, S., Zhou, E., Gartner, U., Conejeros, I., Taubert, A. and Hermosilla, C. (2021). *Fasciola hepatica* induces weak NETosis and low production of intra- and extracellular ROS in exposed bovine polymorphonuclear neutrophils. *Developmental and Comparative Immunology*, 114, 103787.
215. Yıldız, K., Şimşek, N. and Gürçan, I. (2022). Determination of extracellular trap structures from sheep polymorphonuclear leukocytes to *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Experimental Parasitology*, 239, 108283.
216. Munoz-Caro, T., Gomez Ceruti, M., Silva, L., Gutierrez-Exposito, D., Wagner, H., Taubert, A. and Hermosilla, C. (2023). *Fasciola hepatica* soluble antigens (FhAg) induce ovine PMN innate immune reactions and NET formation in vitro and in vivo. *Veterinary Research*, 54, 105.
217. Garza, J., Greiner, S. and Browdrige, S. (2018). Ovine vital neutrophil extracellular traps bind and impair *Haemonchus contortus* L3 in a breed-dependent manner. *Parasite Immunology*, 40, 12572.
218. Pellefigues, S., Tang, A., Schmidt, R., White, O., Lamiab, L., Connor, A. and Ronchese, F. (2017). Toll-like receptor 4, but not neutrophil extracellular traps, promote IFN type I expression to enhance Th2 responses to *Nippostrongylus brasiliensis*. *Frontiers in Immunology*, 8, 1575.
219. Bouchery, T., Moyat, M., Sotillo, J., Silverstein, S., Volpe, B., Coakley, G., Tsourouktsoglou, T. and Harris, N. (2020). *Hookworms* evade host immunity by secreting a deoxyribonuclease to degrade neutrophil extracellular traps. *Cell Host & Microbe*, 12(27), 277-289.
220. Yıldız, S., Adrović, A., Taşdemir, E., Baba Zada, K., Aydın, M., Köker, O., Şahin, S., Barut, K. and Kasapçopur, Ö. (2020). Evaluation of co-existing diseases in children with familial Mediterranean fever. *Rheumatology International*, 40(1), 57-64.
221. Timar, A., Lőrincz, M. and Ligeti, E. (2013). Changing world of neutrophils. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 465(12), 1521-1533.

222. Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T. and Akira, S. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host & Microbe*, 12(1), 109-116.
223. Wardini, A., Guimarães-Costa, M., Nascimento, M., Nadaes, N., Danelli, M. and Pinto-da-Silva, L. (2010). Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *Journal of General Virology*, 91, 259-264.
224. Narasaraju, T., Yang, E., Samy, R., Ng, H., Poh, W., Liew, A., Phoon, M. and Chow, V. (2011). Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *The American Journal of Pathology*, 179, 199-210.
225. Zuo, Y., Estes, S., Ali, R., Gandhi, A., Yalavarthi, S., Shi, A. and Knight, J. (2020). Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Science Translational Medicine*, 12(570).
226. Beiter, T., Fragasso, A., Hartl, D. and Niess, A. (2015). Neutrophil extracellular traps: A walk on the wild side of exercise immunology. *Sports Medicine*, 45(5), 625-640.
227. von Brühl, K., Stark, A., Steinhart, S., Chandraratne, I., Konrad, M., Lorenz, M. and Khandoga, A. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 209(4), 819-835.
228. Gupta, M., Joshi, M., Philippova, M., Erne, P., Hasler, P., Hahn, S. and Resink, T. (2010). Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Letters*, 584(14), 3193-3197.
229. Ammollo, F., Semeraro, J., Xu, J., Esmon, N. and Esmon, C. (2011). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(9), 1795-1803.
230. Mocsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *Journal of Experimental Medicine*, 210(7), 1283-1299.
231. Vogelmeier, C. and Döring, G. (1996). Neutrophil proteinases and rhDNase therapy in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, 9(11), 2193-2195.
232. Roghanian, A. and Sallenave, J. (2008). Neutrophil elastase (NE) and NE inhibitors: Canonical and noncanonical functions in lung chronic inflammatory diseases (cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease). *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 21(1), 125-144.
233. Papayannopoulos, D., Staab, D. and Zychlinsky, A. (2011). Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One*, 6(12), e28526.
234. Hahn, S., Giaglis, S., Hoesli, I. and Hasler, P. (2012). Neutrophil NETs in reproduction: From infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Frontiers in Immunology*, 3, 362.

235. Roberts, J. and Redman, C. (1993). Pre-eclampsia: More than pregnancy-induced hypertension. *The Lancet*, 341(8858), 1447-1451.
236. Gupta, P., Hasler, P., Holzgreve, W., Gebhardt, S. and Hahn, S. (2005). Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Human Immunology*, 66(11), 1146-1154.
237. Burton, G. and Jauniaux, E. (2004). Placental oxidative stress: From miscarriage to preeclampsia. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 11(6), 342-353.
238. Hasler, S., Giaglis, S. and Hahn, S. (2016). Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss Medical Weekly*, 146, 14352.
239. McGonagle, D. and McDermott, M. (2006). A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Medicine*, 3(8), 297.
240. Hu, S. C. S., Yu, H. S., Yen, F. L., Lin, C. L., Chen, G. S. and Lan, C. C. E. (2016). Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. *Scientific reports*, 6(1), 31119.
241. Yang, M., Biermann, J., Brauner, J., Liu, Y., Zhao, Y. and Herrmann, M. (2016). New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. *Frontiers in Immunology*, 7, 302.
242. Petretto, M., Bruschi, F., Pratesi, C., Croia, C., Candiano, G., Ghiggeri, G. and Migliorini, P. (2019). Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS One*, 14(7), e0218946.
243. Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J. and Kaplan, M. (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine*, 178, 178.
244. Apel, F., Zychlinsky, A. and Kenny, E. (2018). The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 14(8), 467-475.
245. Gupta, S. and Kaplan, M. (2016). The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 12(7), 402-413.
246. Delgado Rizo, M., Matinez-Guzman, L., Inigues-Gutierrez, A., Garcia-Orozco, A., Alvarado-Navarro, A. and Fafutis-Morris, M. (2017). Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. *Frontiers in Immunology*, 8, 81.
247. Pinegin, N., Vorobjeva, N. and Pinegin, V. (2015). Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 14(7), 633-640.
248. D'Abbondanza, M., Martorelli, E., Ricci, M., De Vuono, S., Migliola, E., Godino, C., Corradetti, S. and Lupattelli, G. (2019). Increased plasmatic NETs by-products in patients with severe obesity. *Scientific Reports*, 9(1), 14678.

249. Chamardan, T. and Amiritavassoli, S. (2022). Inhibition of NETosis for treatment purposes: Friend or foe? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477(3), 673-688.
250. Mohammed, B., Fisher, D., Kraskauskas, D., Farkas, D., Brophy, D., Fowler III, A. and Natarajan, R. (2013). Vitamin C: A novel regulator of neutrophil extracellular trap formation. *Nutrients*, 5(8), 3131-3151.
251. Brighton, T., Eikelboom, J., Mann, K., Mister, R., Gallus, A., Ockelford, P., Gibbs, H. and Simes, J. (2012). Low-dose aspirin for preventing recurrent venous thromboembolism. *New England Journal of Medicine*, 367(21), 11979-1987.
252. Patrono, C. (1994). Aspirin as an antiplatelet drug. *New England Journal of Medicine*, 330(18), 1287-1294.
253. Catella-Lawson, M., Reilly, S., Kapoor, S., Cucchiara, A., DeMarco, S., Tournier, B., Vyas, S. and FitzGerald, G. (2001). Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *New England Journal of Medicine*, 345(25), 1809-1817.
254. Hawez, A., Al-Haidari, R., Madhi, R., Rahman, M. and Thorlacius, H. (2019). MiR-155 regulates PAD4-dependent formation of neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology*, 10, 2462.
255. Witalison, X., Cui, C., Causey, P., Thompson, P. and Hofseth, L. (2015). Molecular targeting of protein arginine deiminases to suppress colitis and prevent colon cancer. *Oncotarget*, 6(34), 36053-36062.
256. Tauber, S. and Nau, R. (2008). Immunomodulatory properties of antibiotics. *Current Molecular Pharmacology*, 1(1), 68-79.
257. Bystrzycka, A., Manda-Handzlik, S., Sieczkowska, A., Moskalik, A., Demkow, U. and Ciepiela, O. (2017). Azithromycin and chloramphenicol diminish neutrophil extracellular traps (NETs) release. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2666.
258. Zawrotniak, M., Kozik, A. and Rapala-Kozik, M. (2015). Selected mucolytic, anti-inflammatory and cardiovascular drugs change the ability of neutrophils to form extracellular traps (NETs). *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 465-473.
259. Demers, M. and Wagner, D. D. (2013). Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. *Oncoimmunology*, 2(2), e22946.
260. Ho-Tin-Noé, C., Carbo, M., Demers, M., Cifuni, S., Goerge, T. and Wagner, D. (2009). Innate immune cells induce hemorrhage in tumors during thrombocytopenia. *The American Journal of Pathology*, 175(4), 1699-1708.
261. Cedervall, T., Zhang, Y., Huang, H., Zhang, L., Femel, J., Dimberg, A. and Olsson, A. (2015). Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals. *Cancer Research*, 75(13), 2653-2662.

262. Khan, U., Chowdhury, S., Billah, M., Islam, K., Thorlacius, H. and Rahman, M. (2021). Neutrophil extracellular traps in colorectal cancer progression and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7260.
263. Cristinziano, L., Modestino, L., Antonelli, A., Marone, G., Simon, H., Varricchi, G. and Galdiero, M. (2022). *Seminars in Cancer Biology*. New York: Academic Press, 36-45.
264. Huang, H., Zhang, H., Onuma, A. E., Tsung, A. and Birbrair, A. (2020). Tumor Microenvironment, State of the Science. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1263, 13-23.
265. Abi Abdallah, C. and Denkers, E. (2012). Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Frontiers in Immunology*, 3, 382.
266. Pruchniak, M., Kotula, I. and Manda Handzlik, A. (2015). Neutrophil extracellular traps (NETs) impact upon autoimmune disorders. *Central European Journal of Immunology*, 40(2), 217-224.
267. Amagai, M. and Matsushima, K. (2011). Overview on autoimmunity and autoinflammation. *Inflammation and Regeneration*, 31(1), 50-51.
268. Doria, A., Zen, M., Bettio, S., Gatto, M., Bassi, N., Nalotto, L., Ghirardello, A., Iaccarino, L. and Punzi, L. (2012). Autoinflammation and autoimmunity: Bridging the divide. *Autoimmunity Reviews*, 12(1), 22-30.
269. Kaufmann, S. (2008). Immunology's foundation: The 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology*, 9(7), 705-712.
270. Fidan, S., Koçak, S., Söylemezoğlu, O. and Atak Yücel, A. (2022). A well-intentioned enemy in autoimmune and autoinflammatory diseases: NETosis. *Turkish Archives of Pediatrics Review*, 58(1), 10-19.
271. Tao, M., He, Y., Li, L., Li, Y., Liao, W., Nie, H. and Gao, P. (2023). Identification and validation of immune-associated NETosis subtypes and biomarkers in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. *Front Immunol*, 14, 1177968.
272. Masuda, S., Nakazawa, D., Shida, H., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Tomaru, U. and Ishizu, A. (2016). NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta*, 459, 89-93.
273. Kasprzycka, W., Homa-Mlak, I., Mlak, R. and Małecka-Massalska, T. (2019). Direct and indirect methods of evaluating the NETosis process. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 13(1), 50-56.
274. Agilent. (2024). NETosis. Agilent. Web: <https://www.agilent.com/en/solutions/cell-analysis/immunology/netosis-assays> adresin 3 Aralık 2024 tarihinde erişilmiştir.
275. Stoimenou, M., Tzoros, G., Skendros, P. and Chrysanthopoulou, A. (2022). Methods for the assessment of NET formation: From neutrophil biology to translational research. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15823.

276. Bashir, N., Shah, Y., Hazari, M., Habib, M., Bashir, S., Hilal, N., Banday, M., Asrafuzzaman, S. and Fazili, K. (2016). Novel variants of SERPINA gene: Interplay between alpha1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease. *Biomedical Journal*, 117, 139-149.
277. Seixas, S. and Marques, P. (2021). Known mutations at the cause of alpha-1 antitrypsin deficiency: An updated overview of SERPINA1 variation spectrum. *The American Journal of Clinical Genetics*, 14, 173.
278. Janciauskiene, S. (2001). Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1535(3), 221-235.
279. Foil. (2021). Variants of SERPINA1 and the increasing complexity of testing for alpha-1 antitrypsin deficiency. *Advances in Clinical Diagnosis*, 3, 12.
280. Greene, S., Marciniak, S., Teckman, J., Ferrarotti, I., Brantly, M., Lomas, D., Stoller, J. and McElvaney, N. (2016). α 1-Antitrypsin deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1-17.
281. Silva, D., Oliveira, M. J., Guimaraes, M., Lima, R., Gomes, S. and Seixas, S. (2016). Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) mutation spectrum: three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respiratory Medicine*, 116, 8-18.
282. Dabbagh, G., Laurent, A., Shock, P., Leoni, P., Papakrivopoulou, J. and Chambers, R. (2001). Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways. *Journal of Clinical Pathology*, 186(1), 73-81.
283. Lomas, H. and Parfrey, L. (2004). α 1-Antitrypsin deficiency• 4: Molecular pathophysiology. *Thorax*, 59(6), 529-535.
284. Lomas, D. (2000). Loop-sheet polymerization: The mechanism of alpha1-antitrypsin deficiency. *Respiration Medicine*, 94, 3-6.
285. Potempa, J. (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors: Structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 15957-15960.
286. Köhnlein, T. and Welte, T. (2008). Alpha-1 antitrypsin deficiency: Pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *American Journal of Medicine*, 121(1), 3-9.
287. de Serres, F., Blanco, I. and Fernandez-Bustillo, E. (2006). Estimated numbers and prevalence of PDS and PDZ deficiency alleles of α 1 antitrypsin deficiency in Asia. *European Respiratory Journal*, 28(6), 1091-1099.
288. Lieberman, J., Winter, B. and Sastre, A. (1986). Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. *Chest*, 89(3), 370-373.

289. Purkayastha, J., Klemke, S., Lavender, S., Oyola, R., Cooperman, B. and Gai, F. (2005). Alpha 1-antitrypsin polymerization: A fluorescence correlation spectroscopic study. *Biochemistry*, 44(7), 2642-2649.
290. Hadzic, I., Nita, H., Tassidis, K., Riesbeck, K., Wingren, A. and Janciauskiene, S. (2006). Alpha1-antitrypsin inhibits *Moraxella catarrhalis* MID protein-induced tonsillar B cell proliferation and IL-6 release. *Immunology Letters*, 102(2), 141-147.
291. Elliott, D., Bilton, D. and Lomas, D. (1998). Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Medicine*, 236(5), 543-548.
292. Tejwani, V., Nowacki, A., Fye, E., Sanders, C. and Stoller, J. (2019). The impact of delayed diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: The association between diagnostic delay and worsened clinical status. *Respiratory Care*, 64(8), 915-922.
293. Dowson, P., Guest, R. and Stockley, R. (2001). Longitudinal changes in physiological, radiological, and health status measurements in alpha(1)-antitrypsin deficiency and factors associated with decline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(10), 1805-1809.
294. Parr, D., Stoel, B., Stolk, J. and Stockley, R. (2004). Pattern of emphysema distribution in alpha1-antitrypsin deficiency influences lung function impairment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(11), 1172-1178.
295. Cox, D. and Talamo, R. (1979). Genetic aspects of pediatric lung disease. *Pediatric Clinics of North America*, 26(3), 467-480.
296. Molloy, K., Hersh, V., Morris, V., Carroll, T., O'Connor, C., Lasky-Su, J., Greene, C., O'Neill, S., Silverman, E. and McElvaney, N. (2014). Clarification of the risk of chronic obstructive pulmonary disease in α 1-antitrypsin deficiency PiMZ heterozygotes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(4), 419-427.
297. Hersh, M., Dahl, N., Ly, N., Berkey, C., Nordestgaard, B. and Silverman, E. (2004). Chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin PI MZ heterozygotes: A meta-analysis. *Thorax*, 59(10), 843-849.
298. Pittschieler, K. (2002). Liver involvement in alpha1-antitrypsin-deficient phenotypes PiSZ. *Acta Paediatrica*, 91(2), 239-240.
299. Perlmutter, D. (2004). Alpha-1-antitrypsin deficiency: Diagnosis and treatment. *Clinical Liver Disease*, 8(4), 839-859.
300. Sveger, T. (1988). The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 77(6), 847-851.
301. Sveger, T. (1976). Liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *The New England Journal of Medicine*, 294(24), 1316-1321.
302. Eriksson, S. (1987). Alpha 1-antitrypsin deficiency and liver cirrhosis in adults. An analysis of 35 Swedish autopsied cases. *Acta Medica Scandinavica*, 221(5), 461-467.

303. Eriksson, J., Carlson, J. and Velez, R. (1986). Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha1-antitrypsin deficiency. *New England Journal of Medicine*, 314, 736-739.
304. Perlmutter, D. (2006). Pathogenesis of chronic liver injury and hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Pediatric Research*, 60(2), 233-238.
305. Hussain, G., Mieli Vergani, G. and Mowat, A. (1991). Alpha 1-antitrypsin deficiency and liver disease: clinical presentation, diagnosis and treatment. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14(4), 497-511.
306. Bergin, K., Hurley, K., McElvaney, N. and Reeves, E. (2012). Alpha-1 antitrypsin: A potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent. *Archives in Environmental & Technology*, 60, 81-97.
307. Loring, R. and Flotte, T. (2015). Current status of gene therapy for α -1 antitrypsin deficiency. *European Opinion on Biotechnology*, 15(3), 329-336.
308. Janciauskiene, R., Bals, R., Koczulla, A., Vogelmeier, C., Köhnlein, T. and Welte, T. (2011). The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respiration Medicine*, 105(8), 1129-1139.
309. Bergin, D., Hurley, K., McElvaney, N. and Reeves, E. (2012). Alpha-1 antitrypsin: A potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent. *Archives in Environmental & Technology*, 60, 81-97.
310. Sark, M., Fromme, B., Olejnicka, A., Welte, T., Strnad, P., Janciauskiene, S. and Stolk, J. (2022). The relationship between plasma alpha-1-antitrypsin polymers and lung or liver function in ZZ alpha-1-antitrypsin-deficient patients. *Journal of Biological Chemistry*, 12(3), 380.
311. Subramaniam, D., Glader, P., von Wachenfeldt, K., Burneckiene, J., Stevens, T. and Janciauskiene, S. (2006). C-36 peptide, a degradation product of α 1-antitrypsin, modulates human monocyte activation through LPS signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(4), 563-575.
312. Jonigk, D., Al-Omari, M., Maegel, L., Müller, M., Izykowski, N., Hong, J., Hong, K., Kim, S., Dorsch, M. and Mahadeva, R. (2013). Antiinflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37), 15007-15012.
313. ATS-ERS. (2003). Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(7), 818-900.
314. Lee, J. and Brantly, M. (2000). Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles. *Respiration Medicine*, 94, 7-11.
315. Ferrarotti, G., Carroll, T., Ottaviani, S., Fra, A., O'Brien, G., Molloy, K., Corda, L., Medicina, D., Curran, D. and McElvaney, N. (2014). Identification and characterisation of eight novel SERPINA1 Null mutations. *Journal of Research in Disease*, 9, 1-9.

316. Matamala, M., Martinez, B., Lara, L., Perez, I., Vázquez, A., Jimenez, A. and Janciauskiene, S. (2015). Alternative transcripts of the SERPINA1 gene in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), 1-11.
317. Brantly, M., Nukiwa, T. and Crystal, R. (1988). Molecular basis of alpha-1-antitrypsin. *The American Journal of Medicine*, 84, 13-31.
318. Fregonese, L. and Stolk, J. (2008). Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Journal of Research in Disease*, 3(1), 1-9.
319. Karatas, M. and Bouchecareilh, M. (2020). Alpha 1-antitrypsin deficiency: a disorder of proteostasis-mediated protein folding and trafficking pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1493.
320. Kelly, C., Greene, T., Carroll, T., McElvaney, N. and O'Neill, S. (2011). Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Journal of Respiratory Medicine*, 4(1), 1-8.
321. Lomas, D., Belorgey, D., Mallya, M., Miranda, E., Kinghorn, K., Sharp, L. and Crowther, D. (2005). Molecular mousetraps and the serpinopathies. *Biochemical Society Transactions*, 33(2), 321-330.
322. Zhang, K., Fugleholm, L., Day, S., Ye, R., Weller, R. and Day, I. (2003). Molecular pathogenesis of subarachnoid haemorrhage. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35, 1341-1360.
323. Ranes, M. and Stoller, J. (2005). A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 26(2), 154-166.
324. Schievink, W., Katzmann, J., Piepgras, D. and Schaid, D. (1996). Alpha-1-antitrypsin phenotypes among patients with intracranial aneurysms. *Journal of Neurosurgery*, 84, 781-784.
325. Haimovici, E., Ascer, L. and Hollier, L. (1996). *Vascular surgery*, Massachusetts: Blackwell Science, 46-52.
326. St Jean, B., Hart, M., Webster, M., Steed, D., Adamson, J., Powell, J. and Ferrell, R. (1996). Alpha-1-antitrypsin deficiency in aneurysmal disease. *Human Heredity*, 46(2), 92-97.
327. Delbosc, S., Rouer, M., Alsac, J., Louedec, L., Philippe, M., Meilhac, O., Whatling, C. and Micel, J. (2014). Elastase inhibitor AZD9668 treatment prevented progression of experimental abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*, 63(2), 486-492.
328. Wilson, J., Lindholt, S., Hoskins, P., Heickendorff, L., Vammen, S. and Bradbury, A. (2001). The relationship between abdominal aortic aneurysm distensibility and serum markers of elastin and collagen metabolism. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 21(2), 175-178.

329. de Serres, F. and Blanco, I. (2012). Prevalence of α 1-antitrypsin deficiency alleles PIS and PIZ worldwide and effective screening for each of the five phenotypic classes PIMS, PIMZ, PISS, PISZ, and PI*ZZ: A comprehensive review. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 6(5), 277-295.
330. de Serres, F., Luisetti, M., Ferrarotti, I., Blanco, I. and Fernández-Bustillo, E. (2005). Alpha-1 antitrypsin deficiency in Italy: Regional differences of the PIS and PIZ deficiency alleles. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 63(3), 133-141.
331. Tobin, M., Cook, P. and Hutchison, D. (1983). Alpha 1 antitrypsin deficiency: The clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pi type Z. A survey by the British Thoracic Association. *British Journal of Diseases of the Chest*, 77(1), 14-27.
332. Ogushi, S., Fells, G., Hubbard, R., Straus, S. and Crystal, R. (1987). Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *Journal of Clinical Investigation*, 80(5), 1366-1374.
333. Needham, M. and Stockley, R. (2004). Alpha 1-antitrypsin deficiency. 3: Clinical manifestations and natural history. *Thorax*, 59(5), 441-445.
334. Ortiz, A., Skov, B. and Benfeldt, E. (2005). Alpha1-antitrypsin deficiency-associated panniculitis: case report and review of treatment options. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19(4), 487-490.
335. Elzouki, A., Segelmark, M., Wieslander, J. and Eriksson, S. (1994). Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *Journal of Internal Medicine*, 236(5), 543-548.
336. Aktürk, O. (2020). *Çocukluk çağı safra taşı olgularının etiyolojik açıdan retrospektif olarak değerlendirilmesi*. Tıpta Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Prof. Dr. Cemil Taşçıoğlu Şehir Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul.
337. Mutua, P. and Gershwin, M. (2021). A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: Potential Anti-NETs therapeutics. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 61(2), 194-211.
338. Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 3, 111.
339. Absher, M. (1973). Hemocytometer counting. In *Tissue Culture*. New York: Academic Press, 395-397.
340. Lv, Y., Xu, H., Cheng, Y., Ke, Y., Zhang, X. and Ying, K. (2020). A novel cell-based assay for dynamically detecting neutrophil extracellular traps-induced lung epithelial injuries. *Experimental Cell Research*, 394(2), 112101.
341. Albayrak, Z. and Çürük, M. (2009). Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF). *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18(4), 260-267.
342. Juha, M., Molnar, A., Jakus, Z. and Ledo, N. (2023). NETosis: An emerging therapeutic target in renal diseases. *Frontiers in Immunology*, 14, 1253667.

343. Sadeghi, M., Dehnavi, S., Jamialahmadi, T., Johnston, T. and Sahebkar, A. (2023). Neutrophil extracellular trap: A key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.*, 109843.
344. Mor, R., Gal, A. and Livneh, A. (2003). Abdominal and digestive system associations of familial Mediterranean fever. *American Journal of Gastroenterology*, 98(12), 2594-604.
345. Kallinich, T., Gattorno, M., Grattan, C., De Koning, H., Hoffmann, C., Feist, E., Krause, K. and Simon, A. (2013). Unexplained recurrent fever: when is autoinflammation the explanation?. *Allergy*, 68(3), 285-96.
346. Çelikel, Z., Ekici Tekin, F., Aydın, M., Sezer, M., Kurt, T., Tekgöz, N. and Acar, B. (2021). Çocuklukta Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Tanı Gecikmesini Etkileyen Faktörler. *The Journal of Kırıkkale University Faculty of Medicine*, 23(2), 370-377.
347. Barut, S., Sahin, A., Adrovic, A., Sinoplu, A., Yucel, G., Pamuk, G. and Kasapcopur, O. (2018). Familial Mediterranean fever in childhood: a single-center experience. *Rheumatology International*, 38(1), 67-74.
348. Ottaviani, M., Gorrini, R., Scabini, R., Kadija, Z., Paracchini, E., Mariani, F., Ferrarotti, I. and Luisetti, M. (2011). C reactive protein and alpha1-antitrypsin: relationship between levels and gene variants. *Translational Research*, 157(6), 332-338.
349. Kathiresan, M., Larson, R., Vasan, C., Guo, P., Gona, J., Keaney, J. and Benjamin, E. (2006). Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation*, 113(11), 1415-1423.
350. Hoffman, H. and Broderick, L. (2016). The role of the inflammasome in patients with autoinflammatory diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), 3-14.
351. Mitroulis, I., Skendros, P. and Ritis, K. (2010). Targeting IL-1beta in disease; the expanding role of NLRP3 inflammasome. *European Journal of Internal Medicine*, 21(3), 157-163.
352. Grattagliano, L., Bonfrate, L., Ruggiero, G., Scaccianoce, G., Palasciano, G. and Portincasa, P. (2014). Novel therapeutics for the treatment of familial Mediterranean fever: from colchicine to biologics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 95(1), 89-97.
353. Manukyan, M., Petrek, E., Kriegova, E., Ghazaryan, K., Fillerova, R. and Boyajyan, A. (2013). Activated phenotype of circulating neutrophils in familial Mediterranean fever. *Immunobiology*, 218(6), 892-898.
354. Apostolidou, P., Skendros, P. and Kambas, K. (2016). Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(1), 269-277.

355. Manukyan, M., Petrek, T., Tomankova, A., Martirosyan, A., Tatyana, M., Navratilova, Z., Paulu, D. and Kriegova, E. (2013). Colchicine modulates expression of pro-inflammatory genes in neutrophils from patients with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 27(2), 329-336.
356. Stoler, J., Freytag, B., Orak, B., Unterwalder, N., Henning, S., Heim, K., von Bernuth, H. and Kallinich, T. (2020). Gene-Dose Effect of MEFV gain-of-function mutations determines ex vivo neutrophil activation in familial mediterranean fever. *Frontiers in Immunology*, 11, 716.
357. Skendros, A., Chrysanthopoulou, F., Rousset, K., Kambas, K., Arampatzoglou, A., Mitsios, V., Bocly, A. and Ritis, K. (2017). Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) links stress with IL-1 β -mediated familial Mediterranean fever attack through autophagy-driven neutrophil extracellular traps. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(5), 1378-1387.
358. Manukyan, M., Petrek, E., Kriegova, E., Ghazaryan, K., Fillerova, R. and Boyajyan, A. (2013). Activated phenotype of circulating neutrophils in familial Mediterranean fever. *Immunobiology*, 218(6), 892–8.
359. Dinarello, C. and van der Meer, J. (2013). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in Immunology*, 25, 469–84.
360. Mitroulis, I., Kourtzelis, K., Kambas, K., Chrysanthopoulou, A. and Ritis, K. (2011). Evidence for the involvement of mTOR inhibition and basal autophagy in familial Mediterranean fever phenotype. *Human Immunology*, 72, 135–8.
361. Remijsen, T., Vanden Berghe, E., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R. and Vandenabeele, P. (2011). Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Research*, 21(2), 290–304.
362. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. (2014). *Journal of Pathology*, 233(3), 294-307.
363. Skendros, K., Papagoras, C., Mitroulis, I. and Ritis, K. (2019). Autoinflammation: Lessons from the study of familial Mediterranean fever. *Journal of Autoimmunity*, 104, 102305.
364. Michailidou, D., Kuley, R., Wang, T., Hermanson, P., Grayson, P., Cuthbertson, D. and Lood, C. (2023). Neutrophil extracellular trap formation in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated and large-vessel vasculitis. *Clinical Immunology*, 249, 109274.
365. Mukhopadhyay, S., Sinha, S. and Mohapatra, S. (2021). Analysis of transcriptomic data sets supports the role of IL-6 in NETosis and immunothrombosis in severe COVID-19. *BMC Genom Data.*, 22(1), 49.
366. Bakalović, D., Bokonjić, D., Mihajlović, M., Čolić, M., Mališ, V., Drakul, M. and Ljuboja, O. (2023). Dysfunctions of Neutrophils in the Peripheral Blood of Children with Cystic Fibrosis. *Biomedicine*, 11(6), 1725.

367. Biswas, S., Sarojini, S., Jayaram, S., Philip, I., Umesh, M., Mascarenhas, R., Pappuswamy, M., Balasubramanian, B. and Arokiyaraj, S. (2023). Understanding the Role of Antimicrobial Peptides in Neutrophil Extracellular Traps Promoting Autoimmune Disorders. *Life (Basel)*, 13(6), 1307.
368. Yipp, B. and Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it?. *Blood*, 122(16), 2784-94.
369. Acuff, K., Carter, B., Fingleton, D., Gorden, D. and Matrisian, L. (2006). Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Research*, 66(1), 259-266.
370. Kuhns, D., Long Priel, D., Chu, J. and Zarembek, K. (2015). Isolation and functional analysis of human neutrophils. *Current Protocols in Immunology*, 111(7), 1-7.
371. Muñoz-Buenrostro, A., Arce-Mendoza, E., Montes-Zapata, R., Calderón-Meléndez, P. and Montelongo-Rodríguez, M. (2020). Simplified neutrophil isolation protocol. *International Journal of Immunology and Immunotherapy*, 7(41).
372. Baker, A., Fiore, E., Connolly, K., Baker, K. and Solomon, R. (1995). Serum elastase and alpha-1-antitrypsin levels in patients with ruptured and unruptured cerebral aneurysms. *Neurosurgery*, 37(1), 52-61.
373. Mazzuca, C., Vitiello, L., Travaglini, S., Maurizi, F., Finamore, P., Santangelo, S., Rigon, A., Vadacca, M., Angeletti, S. and Scarlata, S. (2024). Immunological and homeostatic pathways of alpha -1 antitrypsin: a new therapeutic potential. *Front Immunol*, 15, 1443297.
374. Hiemstra, P. (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 116-20.
375. Ehlers, M. (2014). Immune-modulating effects of alpha-1 antitrypsin. *Biological Chemistry*, 395(10), 1187-93.

EKLER

EK-1. Etik Kurulu Karar Formu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU							
ETİK KURUL İLETİŞİM BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi (GÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu					
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık (GÜTF) Binası 06500 Beşevler/Ankara					
	TELEFON						
	FAKS						
	E-POSTA						
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	α1-Antitripsin (AAT) Akut Faz Reaktanının; Allevi Akdeniz Ateşi (AAA) Olan Çocuklarda Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları (NET) Oluşumu Üzerine Etkisi					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Hatice Kibriya FİDAN					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı / GÜTF					
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)						
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Prof.Dr Ayşegül Atak Yücel, Prof.Dr.Oğuz Söylemezoğlu, Prof.Dr.Özlem Gülbahar, Biyolog Senem Koçak					
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji kolleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Hücre ve doku kültürleriyle yapılacak in-vitro çalışmalar- Bireysel araştırma projesi					
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dil			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	18.03.2022	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐			
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	18.03.2022	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐			
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒					
	BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 258	Toplantı tarihi: 04.04.2022					
	α1-Antitripsin (AAT) Akut Faz Reaktanının; Allevi Akdeniz Ateşi (AAA) Olan Çocuklarda Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları (NET) Oluşumu Üzerine Etkisi başlıklı başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına GÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.						
	Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.						
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI		Prof. Dr Ebru ARHAN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırmayla İlgisi	Katılım	İmza	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Soyadı, adı : FİDAN, Hatice Kibriya
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 14.05.1966, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : +90 533 732 03 55
 e-mail : kibriya@gazi.edu.tr

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/ İmmünoloji Ana Bilim Dalı	Devam Ediyor
Tıpta Uzmanlık	SSK Ankara Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi / Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı	1996
Lisans	Ankara Üniversitesi / Tıp Fakültesi	1989
Lise	Tekirdağ Anadolu Lisesi	20...

İş Deneyimi, Yıl	Yer	Görev
2021-devam ediyor	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı	Prof. Dr.
2013-2021	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı	2013-2021
2008-2013	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı	2008-2013
2009-2010	Great Ormond Street Hospital, Department of Pediatric Nephrology Londra	2009-2010
2007-2008	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı	2007-2008
2004-2007	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı	2004-2007
1999-2004	SSK Etlik Kadın Hastalıkları Eğitim Hastanesi Yenidoğan Yoğunbakım	1999-2004
1997-1999	SSK Erzurum Hastanesi Çocuk ve Kadın Doğum Hastanesi	1997-1999

1991-1996	SSK Ankara Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	1991-1996
1989-1991	Sağlık Bakanlığı Sivas Numune Hastanesi Acil Servis	1989-1991

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Gülhan, B., Özaltın, F., Fidan, K., Özçakar, Z. B., and Söylemezoğlu, O. (2024). Management of pediatric hemolytic uremic syndrome. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 66(1), 1-16.
2. Celegen, K., Gulhan, B., Fidan, K., Yuksel, S., Yilmaz, N., Yılmaz, A.C., Demircioğlu Kılıç, B., Gokce, I., Kavaz Tufan, A., Kalyoncu, M., Nalcacıoglu, H., Ozlu, S.G., Kurt Sukur, E.D., Canpolat, N. K., Bayazit, A., Çomak, E., Tabel, Y., Tulpar, S., Celakil, M., Bek, K., Zeybek, C., Duzova, A., Özçakar, Z.B., Topaloglu, R., Soylemezoglu, O., and Ozaltin, F. (2024). Adolescence-onset atypical hemolytic uremic syndrome: is it different from infant-onset?. *Clinical and Experimental Nephrology*, 28(10), 1027-1037.
3. Leventoğlu, E., Fidan, K., Büyükkaragöz, B., Serdaroğlu, E., Atalay, T., Yazol, M., and Söylemezoğlu, O. (2022). Systemic vasculopathy and hypertension in a child: Questions. *Pediatric Nephrology*, 37(1), 113-115.
4. Sözen, H., Fidan, K., Özen, O., Söylemezoğlu, O., and Dalgıç, A. (2017). Surgical Complications After Pediatric Renal Transplant. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*, 17(3), 344-347.
5. Leventoğlu, E., Dönmez, E., Uzun Kenan, B., Yazıcıoğlu, B., Büyükkaragöz, B., Fidan, K., and Söylemezoğlu, O. (2024). LAMB2 gene: broad clinical spectrum in Pierson syndrome. *CEN Case Reports*, 13(4), 258-263.
6. Leventoğlu, E., Deniz, E. B., Kara Ulu, N., Polat, M., and Fidan, K. (2023). A rare isolated kidney cyst: hydatid cyst. *Cureus*, 15(5), e38566.
7. Leventoğlu, E., Büyükkaragöz, B., Kavas, F. Ç., Holoğlu, M. C., Kavgacı, A., Fidan, K., .and Söylemezoğlu, O. (2023). Electrocardiographic measurements in children with pre-dialysis chronic kidney disease and undergoing kidney replacement therapy. *European Journal of Pediatrics*, 182(11), 4993-5005.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Türk Tabipleri Birliği
2. Milli Pediatri Derneği

3. Çocuk Nefroloji Derneği
4. Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği
5. Çocuk Romatoloji Derneği
6. European Society of Pediatric Nephrology
7. European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association
8. Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiđi Derneği
9. Çocuk Romatizma ve Böbrek Hastalıkları Derneği
10. International Pediatric Transplantation Association (IPTA)

Hobiler

-



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..