



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**PSÖRİYATİK ARTRİTTE NETOZİS GELİŞİMİ VE ETKİLEYEN
FAKTÖRLERİN KLİNİK BULGULAR İLE İLİŞKİSİNİN
ROMATOİD ARTRİT İLE KARŞILAŞTIRILARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

PAYAM NEMATIATTAR

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2024



**PSÖRİATİK ARTRİTTE NETOZİS GELİŞİMİ VE ETKİLEYEN
FAKTÖRLERİN KLİNİK BULGULAR İLE İLİŞKİSİNİN ROMATOİD
ARTRİT İLE KARŞILAŞTIRILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Payam NEMATIATTAR

**DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2024

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.

Payam Nematiattar

02.07.2024

PSÖRİATİK ARTRİTTE NETOZİS GELİŞİMİ VE ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN
KLİNİK BULGULAR İLE İLİŞKİSİNİN ROMATOİD ARTRİT İLE
KARŞILAŞTIRILARAK DEĞERLENDİRİLMESİ
(Doktora Tezi)

Payam NEMATIATTAR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2024

ÖZET

Psöriatik artrit (PsA), genellikle sedef hastalığı olan bireylerde ortaya çıkan, eklem hasarı ve deri bulguları ile seyreden enflamatuvar bir hastalıktır. Nötrofiller, fagositik özelliklerinin yanı sıra, "Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları (NET)" olarak adlandırılan farklı bir patojen öldürme stratejisi de kullanırlar. NETozis sırasında, nötrofiller kromatinlerini antimikrobiyal peptitlerle birlikte hücre dışı ortama salarlar. NET'lerin, bazı regülasyon mekanizmalarının bozulması durumunda konakta doku hasarlarına, otoimmün ve/veya otoenflamatuvar sürecin gelişimine neden olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada, PsA'lı hastaların nötrofillerinin romatoid artrit hastaları ve sağlıklı bireylere göre NET formasyonunu indüklemeye kabiliyeti ve bunun hastalığın şiddeti ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışmaya 22 Romatoid Artrit (RA)'lı, 22 PsA'lı hasta ve 22 sağlıklı gönüllü olacak şekilde 3 grup dahil edilmesi planlandı. Nötrofiller, periferik venöz kandan dansite gradyanı separasyon yöntemiyle izole edildi; ticari olarak mevcut olan NETozis Test Kiti, NETozis *ex vivo* sürecini incelemek için kullanıldı. İlâveten, PsA'lı hastalardan alınan serumların sağlıklı kişilerin nötrofillerinden salınan NET'leri parçalama kabiliyetini belirlemek için, nötrofil hücre kültüründe oluşan NET'leri PsA'lı hastaların serumu ile 6 saat inkübe ederek çalışıldı. Bu çalışmalara ek olarak, serumda NET formasyonunu etkileyebilecek bir faktör olan katelisin ailesinden bir insan antimikrobiyal peptidi olan LL-37 düzeyi enzime bağlı immünosorbent assay (ELISA) metodu ile ölçüldü ve üç grup arasında karşılaştırma yapıldı. Sağlıklı kontrol grubuna kıyasla PsA ve RA gruplarındaki nötrofillerde NET formasyonunun daha yüksek olduğu bulundu. PsA'lı hastalardan izole edilen nötrofillerin, PMA ile uyarıldığında NETozis gerçekleştirmeye daha hassas oldukları ve daha fazla NET ürettikleri bulundu. PsA'lı hastalarda NET degradasyon kabiliyeti, RA'lı hastalar ve sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında daha düşüktü. LL-37 düzeyleri PsA grubunda, RA grubu ve sağlıklı kişilere göre daha yüksek bulundu. LL-37'nin kronik enflamasyon yolağının araştırılması ve NETozis'in PsA patogenezindeki rolü ve hastalık aktivitesini yansıtan bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini açığa kavuşturmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bilim Kodu : 1089

Anahtar Kelimeler : Psöriatik artrit, Romatoid artrit, NETozis, LL-37

Sayfa Adedi : 144

Danışman : Prof. Dr. Ayşegül ATA K YÜCEL

İkinci Danışman : Prof. Dr. Berivan BİTİK

EVALUATION OF THE DEVELOPMENT OF NETOSIS IN PSORIATIC ARTHRITIS
AND ITS RELATIONSHIP BETWEEN AFFECTING FACTORS AND CLINICAL
FINDINGS IN COMPARISON WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

(Ph. D. Thesis)

Payam NEMATIATTAR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2024

ABSTRACT

Psoriatic arthritis (PsA) is an inflammatory disease that typically occurs in individuals with psoriasis, characterized by joint destruction and skin manifestations. In addition to their phagocytic properties, neutrophils employ a different pathogen-killing strategy known as "Neutrophil Extracellular Traps (NETs)." During NETosis, neutrophils release their chromatin into the extracellular environment along with antimicrobial peptides. It has been reported that NETs can lead to tissue damage and the development of autoimmune and/or autoinflammatory processes when certain regulatory mechanisms are disrupted. This study aimed to investigate the ability of neutrophils from PsA patients to induce NET formation compared to rheumatoid arthritis (RA) patients and healthy individuals, and its correlation with disease severity. The study planned to include three groups: 22 RA patients, 22 PsA patients, and 22 healthy volunteers. Neutrophils were isolated from peripheral venous blood using density gradient separation, and a commercially available NETosis Test Kit was used to examine NETosis *ex vivo* process. Additionally, to determine the ability of serum samples of PsA patients to degrade NETs released from neutrophils of healthy individuals, we incubated the NETs formed in neutrophil cell culture with the serum from PsA patients for 6 hours. Furthermore, the serum the levels of LL-37, a human antimicrobial peptide from cathelicidin family, which is a factor that may influence NET formation, were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a comparison was made among the three groups. It was found that NET formation in neutrophils was higher in the PsA and RA groups compared to the healthy control group. Neutrophils isolated from PsA patients were found to be more sensitive to undergoing NETosis when stimulated with PMA and produced more NETs. The ability to degrade NETs in PsA patients was lower than in RA patients and healthy individuals. LL-37 levels were higher in the PsA group compared to rheumatoid arthritis patients and healthy individuals. Further studies are needed to investigate the role of LL-37 in the chronic inflammatory pathway, and to elucidate the role of NETosis as a biomarker reflecting the pathogenesis of PsA and disease activity.

Science Code : 1089

Key Words : Psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis, NETosis, LL-37

Page Number : 144

Supervisor : Prof. Dr. Ayşegül ATAĞ YÜCEL

Co-Supervisor : Prof. Dr. Berivan BİTİK

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın bilimsel açıdan en öğretici olduğu, doktora eğitimine başlamam konusunda beni destekleyen, eğitim sürecinde bilgisini benimle paylaşan, sabırla tez çalışmamda rehberliğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ayşegül ATAĞ YÜCEL'e saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı'ndan ikinci danışman hocam Prof. Dr. Berivan Bitik'e tez çalışma dönemimdeki ve Gazi Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı'ndan hocalarım Prof. Dr. Emin Ümit Bağrıaçık'a ve Prof. Dr. Resul Karakuş'a immünoloji eğitimin boyunca verdikleri eğitim ve destekleri için teşekkür eder, şükranlarımı sunarım. İmmünoloji Ana Bilim Dalı Hocalarımız Prof. Dr. Vedat Bulut ve Prof. Dr. Cemalettin Aybay'a saygılarımı sunarım. Ayrıca, çalışmamda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Meral Sarper'e de teşekkür etmek isterim. Tez çalışmalarımız sırasında birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Prof. Dr. Hatice Kibriya Fidan'a, deneylerimi gerçekleştirdiğim İmmünoloji Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarım Ülger Fettahlıoğlu, Göksu Ceylan ve Süleyman Balcı'ya çalışmalarım süresince gösterdikleri sürekli destek ve yardımları için, birlikte eğitim aldığım tüm doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve hep yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Nötrofil Biyolojisi.....	5
2.1.1. Nötrofil homeostazı.....	5
2.1.2. Nötrofil heterojenitesi	6
2.1.3. Nötrofil aktivasyonu ve efektör fonksiyonları.....	7
2.2. Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları.....	10
2.2.1. NET formasyonu	12
2.2.2. NETozis regülasyonu (düzenlenmesi).....	16
2.2.3. NET'lerin mikroplara karşı savunmada rolü	17
2.2.4. NET'lerin doku hasarındaki rolü.....	19
2.2.5. NET'lerin otoimmünitede ve sistemik otoenflamasyondaki rolü	23
2.2.6. Potansiyel Anti-NET terapötik hedefler	27
2.3. Romatoid Artrit	30
2.3.1. Romatoid artrit epidemiyolojisi ve etiyolojisi.....	31
2.3.2. Romatoid artrit klinik belirtileri ve sınıflandırma kriterleri	32

	Sayfa
2.3.3. Romatoid artrit immünopatolojisi.....	33
2.3.4. Romatoid artrit patogeneğinde NETozis'in rolü.....	37
2.4. Psöriatik Artrit.....	40
2.4.1. Psöriatik artrit epidemiyolojisi ve etiyolojisi.....	40
2.4.2. Psöriatik artrit klinik belirtileri ve sınıflandırma kriterleri	41
2.4.3. Psöriatik artrit immünopatolojisi.....	43
2.4.4. Psöriazisin psöriatik artrite ilerlemesini sağlayan model	51
2.4.5. Psöriatik artrit patogeneğinde NETozis'in rolü.....	53
2.5. LL-37 (Katelisidin).....	54
2.5.1. LL-37'nin yapısı ve ekspresyonu	55
2.5.2. LL-37'nin efektör fonksiyonları.....	55
2.5.3. LL-37'nin otoimmün hastalıklardaki rolü.....	57
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	61
3.1. Çalışmaya Alınan Grupların Demografik ve Klinik Özellikleri.....	61
3.2. Araştırmaya Dahil Olma ve Dışlama Kriterleri	63
3.3. Örneklerin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması	63
3.4. Alınan Örneklerden Nötrofillerin İzolasyonu	64
3.4.1. Nötrofillerin izolasyonun temel prensibi.....	64
3.4.2. Nötrofillerin izolasyonun prosedürü	65
3.4.3. İzole edilen nötrofillerin canlılık oranının belirlenmesi.....	66
3.4.4. Nötrofillerin izolasyonunda kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler	66
3.5. Nötrofillerde NET Formasyon ve Degradasyonun Ölçümü.....	67
3.5.1. NET formasyonun ölçümünün temel prensibi.....	67
3.5.2. NET formasyon ölçümünde hazırlanan çözeltiler ve hazırlanış biçimleri.....	68
3.5.3. NET formasyonu ölçümü	68

	Sayfa
3.5.4. NET degradasyon testi	70
3.5.5. NET formasyon ölçümünde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler.....	71
3.6. ELISA Yöntemiyle Serum LL-37 Seviyelerinin Belirlenmesi	72
3.6.1. Serum LL-37 ölçümünün çalışma prosedürü.....	72
3.6.2. Serum LL-37 ölçümünde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler	73
3.7. İstatistiksel Analiz.....	74
4. BULGULAR	77
4.1. Çalışmaya Alınan Grupların Demografik ve Klinik Özellikleri.....	77
4.2. Çalışma Gruplarında NET Formasyon Düzeyleri	81
4.3. Hasta Gruplarının NET Formasyon Düzeylerinin Hastalık Şiddetiyle Karşılaştırılması.....	84
4.4. Çalışma Gruplarında Uyarılmış ve Uyarılmamış Nötrofillerinde NET Formasyon Düzeylerinin Karşılaştırması.....	88
4.5. Kontrol Grubu Nötrofillerinde PsA Serumu ile NET Degradasyon Düzeyleri..	89
4.6. Çalışma Gruplarının Serum LL-37 Düzeyleri.....	91
5. TARTIŞMA.....	97
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	107
KAYNAKLAR	109
EKLER.....	141
EK-1. Etik Kurul Onayı	142
ÖZGEÇMİŞ	144

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Nötrofil ekstraselüler tuzak yapısının ana proteinleri.....	11
Çizelge 2.2. Nötrofil ekstraselüler tuzak formasyonu tetikleyenler.....	12
Çizelge 2.3. Potansiyel Anti-NET terapötik hedefler.....	27
Çizelge 2.4. ACR ve Avrupa Romatoloji Birliği (EULAR) tarafından RA sınıflandırma kriterleri.....	33
Çizelge 2.5. RA ve PsA arasındaki demografik ve klinik farklılıklar.....	42
Çizelge 2.6. CASPAR kriterleri.....	43
Çizelge 3.1. Çalışmaya dahil edilen örneklerin gruplandırılması.....	62
Çizelge 3.2. Nötrofillerin izolasyonunda kullanılan cihazlar, malzemeler ve kimyasallar.....	66
Çizelge 3.3. NET formasyon ölçümünde kullanılan cihazlar, malzemeler ve kimyasallar.....	71
Çizelge 3.4. LL-37 ölçümünde kullanılan cihazlar, malzemeler ve kimyasallar.....	73
Çizelge 4.1. Gruplara göre olguların demografik özellikleri ve izole edilen lökosit ölçümleri.....	78
Çizelge 4.2. Romatoid artrit ve psöriatik artrit hasta gruplarında olguların klinik özellikleri ve laboratuvar ölçümleri.....	80
Çizelge 4.3. Farklı gruplarda olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinin NETozis düzeyleri.....	82
Çizelge 4.4. Tanı ve hastalık şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri.....	85
Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grupları arasında hastalık şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri farkları açısından yapılan karşılaştırmalar.....	86
Çizelge 4.6. Farklı gruplarda olguların serum LL-37 düzeyleri.....	91
Çizelge 4.7. Tanı ve hastalık şiddetine göre olguların serum LL-37 düzeyleri.....	94
Çizelge 4.8. Gruplar içerisinde NETozis düzeyleri ile serum LL-37 düzeyi ölçümleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri.....	95
Çizelge 4.9. Tüm olgular içerisinde NETozis düzeyleri ile serum LL-37 düzeyi ölçümleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri.....	96

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Nötrofillerin yaşam döngüsü ve fonksiyonları.....	10
Şekil 2.2. Nötrofil ekstraselüler tuzak formasyon mekanizmaları.....	15
Şekil 2.3. Otoimmün hastalıklarda NET'in rolleri.....	26
Şekil 2.4. Romatoid artrit başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynayan mekanizmalar.....	35
Şekil 2.5. Uyarılmış nötrofillerde üretilen bir dizi sitrülünlenmiş protein.....	38
Şekil 2.6. Romatoid artrit patogeneğinde NETozis'in rolü.....	39
Şekil 2.7. Psöriatik artrit patogeneğinde rol oynayan hücreler ve sitokinler.....	46
Şekil 2.8. Osteoklastogeneğinde OSCAR ligandın rolü.....	51
Şekil 2.9. Psöriazis immünopatogeneğinde keratinositlerin salgıladığı DNA'nın rolü.....	53
Şekil 2.10. SLE patogeneğinde nötrofil ekstraselüler tuzaklarının rolü.....	59
Şekil 3.1. NET formasyon ölçümünün diyagramı.....	67
Şekil 3.2. Nötrofil elastazın standart eğrisi.....	70
Şekil 4.1. Gruplara göre uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik.....	83
Şekil 4.2. Sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarında olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeylerine ilişkin kutu-çizgi grafik.....	83
Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grupları arasında hastalık şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinin NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik.....	87
Şekil 4.4. RA ve PsA grupları içerisinde hastalık şiddetine göre uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik.....	87
Şekil 4.5. Tüm olgular içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri farkına ilişkin hata çubuklu bar grafik.....	88
Şekil 4.6. Sağlıklı kontrol grubu içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerin ve PsA serumu ile degrade olmuş NET'lerin NETozis düzeylerine ilişkin kutu-çizgi grafik.....	89

Sayfa

Şekil 4.7. Sağlıklı kontrol grubu içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri ile PsA serumu ile degrade olmuş NET'lerin NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik.....	90
Şekil 4.8. PsA serumlarının kontrol nötrofillerinde NET degradasyonu üzerine etkileri	90
Şekil 4.9. Sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarında olguların serum LL-37 ölçümlerine ilişkin kutu-çizgi grafik.....	92
Şekil 4.10. Sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarına göre LL-37 ölçümlerine ilişkin hata çubuklu bar grafik.....	92
Şekil 4.11. Romatoid artrit ve psöriatik artrit grupları içerisinde hastalık şiddetine göre LL-37 düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik.....	94

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Romatoid artrit klinik belirtileri.....	32
Resim 2.2. Psöriatik artrit klinik belirtileri.....	41
Resim 3.1. Nötrofil izolasyon protokolünün üç ana basamağı.....	65
Resim 4.1. Nötrofillerin metilen mavisi boyası ile boyanması.....	81
Resim 4.2. Substrat eklendikten sonra çalışmada kullanılan mikropalaklar.....	84
Resim 4.3. Durdurma solüsyonunu ile örneklerin renginin maviden sarıya dönmesi	93

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
-----------------	--------------------

%	Yüzde
°	Derece
C	Selsiyus
g	Gram
k	K sabiti
kDa	Kilodalton
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mU	Miliunit
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
ng	Nanogram
p	P değeri
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

ACPA	Anti-sitrüline protein antikorlar
AMP	Antibiyotik mikrobiyal peptit
ANA	Antinükleer antikorlar
ANCA	Antinötrofil sitoplazmik otoantikor
APC	Antijen sunucu hücre
CASPAR	Psöriatik artrit sınıflandırma kriterleri
CCL	CC-kemokin ligandı

CCP	Siklik sitr�linlenmiř peptid
CCR	CC-kemokin reseptörü
CD	İnsan lökosit farklılaşma antijenleri
CGD	Kronik granülomatöz hastalığı
CR3	Kompleman reseptörü 3
CRP	C-reaktif protein
CV	Sitr�linlenmiř vimentin
CXCL	C-X-C kemokin ligandı
CXCR	C-X-C kemokin reseptörü
DADA2	Adenozin deaminaz 2 eksikliği
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler paternler (şablonlar)
DC	Dendritik hücreler
Del-1	Gelişimsel endotelial lokus-1
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
DVT	Derin ven trombozu
ELISA	Enzim bağlantılı immünosorbent testi
FMLP	Formilmetyonin lösil fenilalanine
FLS	Fibroblast benzeri sinoviyositler
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
GP91^{phox}	Glikoprotein fagositikoksidaz 91
GSDMD	Gasdermin-D
HIV	İnsan immün yetmezliği virüsü
HLA	İnsan lökosit antijeni
HMGB1	Yüksek mobilite grup kutusu 1
ICAM1	İntraselüler adezyon molekülü 1
İFN	İnterferon
İg	İmmünoglobülin
İL	İnterlökin
İLC	Doğal lenfoid hücreler
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İSG	İnterferonla uyarılan genler
JAK	Janus kinaz

LDG	Düşük yoğunluklu granülosit
LDN	Düşük yoğunluklu nötrofiller
LFA-1	Lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen 1
LL-37	Katolisidin antimikrobiyal peptit 37
LPS	Lipopolisakkarit
MAC	Membran atak kompleksi
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MHC	Ana doku uygunluk kompleksi
MMP	Matriks metaloproteinazlar
MPO	Miyeloperoksidaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NE	Nötrofil elastaz
NET	Nötrofil ekstraselüler tuzak
NETozis	Nötrofil ekstraselüler tuzak oluşumu
NFAT	Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü
NF-κB	Nükleer faktör κB
NK	Doğal öldürücü hücre
NKT	Doğal öldürücü T hücre
NOS	Nitrik oksit sentaz
OSCAR	Osteoklastla ilişkili reseptör
PAD	Peptidil arginin deiminaz
PAMP	Patojen ilişkili moleküler paternler (şablonlar)
PBMC	Periferik kan mononükleer hücre
pDC	Plazmasitoid dendritik hücre
PFKL	Fosfofruktokinaz-1
PGE2	Prostaglandin E2
PKC	Protein kinaz C
PMA	Forbol 12-miristat 13-asetat
PMN	Polimorfonükleer lökosit
PR3	Lökosit proteinaz 3
PRR	Patern tanıma reseptörü
PsA	Psöriatik artritis

RA	Romatoid artrit
RANKL	NF-κB ligand
RF	Romatoid faktör
RNA	Ribonükleik asid
ROS	Reaktif oksijen türleri
SARS-CoV-2	Şiddetli akut solunum sendromu korona virüs 2
SIRL-1	Lökosit sinyal inhibitör reseptörü-1
SLE	Sistemik lupus eritematozus
SpA	Spondiloartropati
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TFH	T-foliküler yardımcı hücre
TFPI	Doku faktörü yolu inhibitörünü
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü β
Th	Yardımcı T lenfosit
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF	Tümör nekroze edici faktör
TRALI	Transfüzyona bağlı akut akciğer hasarı
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VWF	Von willebrand faktörü

1. GİRİŞ

Doğuştan gelen (innate) immün yanıtın önemli elemanları arasında yer alan nötrofiller, enfeksiyon ve doku hasarı durumlarında alana ilk çekilen hücrelerdirler. Nötrofiller, ölümcül enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir rol oynarlar ve bu nedenle genellikle "profesyonel fagositler" olarak adlandırılırlar. Dolaşımdaki tüm lökositlerin %50 ila %70'ini oluşturan nötrofiller, bakteri, mantar ve protozoa gibi çok çeşitli bulaşıcı patojenlere karşı konak savunmasının ilk hattını oluştururlar. Her gün yaklaşık 10^{11} nötrofil üretilir ancak bakteriyel enfeksiyonlar sırasında bu sayı günde 10^{12} 'ye çıkabilir. Böylece kemik iliğinin %55 ila %60'ı bunların üretimine ayrılmıştır [1].

Takei ve arkadaşlarının 1992'deki çalışmalarıyla, nötrofillerin fagositik özelliklerinin yanı sıra farklı bir patojen öldürme stratejisi daha kullandığı bildirilmiş ve buna "Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları (NET)" adı verilmiştir. NET oluşumu süreci sonunda gelişen olayların daha yoğun çalışılması sonucunda 2004 yılında "NETozis" olarak adlandırılmıştır [2]. Nötrofil ekstraselüler tuzaklarının oluşumunda, doğal bağışıklığın sensörlerinin uyarılması üzerine, nötrofiller, bilinen en viskoz yapılardan biri olan ve mikroorganizmaları yakalayan kromatinlerini antimikrobiyal peptidlerle (AMP) birlikte hücre dışı ortama salarlar. NET formasyonunu asıl tanımlayan unsur, ekstraselüler alanda yoğunlaşmış ve nötrofile ait kromatindir. Bu yapı sitotoksik özelliklere sahip granüller, nükleer ve sitoplazmik proteinlerle kaplıdır; hücre dışına salınarak patojenin immobilizasyonu ve öldürülmesi sağlanmaktadır [3]. NET'lerin mikrobisidal potansiyellerinde nötrofil elastaz (NE), miyeloperoksidaz (MPO), katepsin G, laktoferrin, pentaksin 3, kalprotektin, katepsin, katelisinler, defensinler, laktoferrin, jelatinaz, proteinaz 3 (PR3) ve peptidoglikan bağlanma proteinleri rol oynamaktadır [4].

Bazı durumlarda, konağı enfeksiyon etkenine karşı koruyucu fonksiyonlar, bazı regülasyon mekanizmaların bozulmasıyla konakta toksik etkiye dönüşebilir. Bu durum özellikle doku hasarlarına, otoimmün ve/veya otoenflamatuvar sürecin gelişimine ve doku fibrozuna neden olabilir. Enfeksiyon sırasında NET'lerin dokulara zarar verme yeteneği iyi anlaşılmıştır. NET'ler, epitel ve endotel hücrelerini doğrudan öldürebilir; aşırı NETozis, pulmoner mantar enfeksiyonunda epitele ve transfüzyona bağlı akut akciğer hasarında (TRALI) endotele zarar verebilir [5]. Antikor aracılı nötralizasyon çalışmaları, NET'e bağlı histonların NET aracılı sitotoksitede merkezi bir rolü olduğunu öne sürmektedir [6]. NET'te bulunan defensinler

gibi proteinler, ökaryotik hücrelerin geçirgenliğini artırır ve NE hücre bağlantılarını bozan hücre dışı matris proteinlerini hedefler [7-9]. Dolaşımda oluşan NET'ler, kanser ve obezite hastalarında derin ven trombozunu (DVT) destekleyen bir ortam sağlarlar [10].

NET, nötrofil kaynaklı proteinlere karşı otoantikorlarla ilişkili olan otoimmün hastalıklarda öz antijen kaynağı olabilir. Düzensiz NET oluşumu, çeşitli NET bileşenlerine karşı otoantikorların üretilmesini ve dolayısıyla otoimmünitenin uyarılmasını teşvik edebilir. NET birikiminin kanıtı ilk olarak antinötrofil sitoplazmik otoantikor (ANCA) ile ilişkili vaskülit olan hastalardan alınan böbrek biyopsi örneklerinde bildirilmiştir. ANCA ile ilişkili vaskülitli hastalarda MPO ve proteinaz-3 gibi NET bileşenlerine karşı antikor üretilir [11, 12]. Lupus komplikasyonlarının, anti-NET otoantikorlarının titreleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir [13].

NET'ler sitriline otoantijenlerin kaynağıdır ve romatoid artrit (RA) enflamatuvar yanıtları uyarır. RA'lı hastaların eklem sıvısında ve romatoid nodüllerde NET bileşenleri tespit edilmiştir [14]. Nötrofiller psöriatik plak oluşumunda dermise infiltre olur ve daha sonra epidermise göç eder. Lezyonlu psöriatik deride salgılanan kemokinler ve AMP nötrofil aktivasyonu tetikler [15]. NET'ler hastaların kan örneklerinde artar ve NET miktarının psöriazis şiddeti ile paralel seyrettiği ortaya konulmuştur [16].

Psöriazis, yaygın bir cilt hastalığı olup birçok eşlik eden durumla ilişkilidir. En sık eşlik eden durum olan psöriatik artrit (PsA), psöriazisli hastaların yaklaşık %30'unda gelişir; klinik özelliklerin çeşitlilik arz etmesi nedeni ile sıklıkla tanı ve tedavi gecikebilir. İlk raporlarda çoğu hastada iyileşmenin olacağını vurgulanmasına rağmen, günümüzde psöriatik artrit genellikle işlev bozukluğuna ve yaşam kalitesinde azalmaya yol açtığı kabul edilmektedir [17, 18]. Dermatologlar tarafından takip edilen sedef hastalarının yaklaşık %15'inde tanı konulamamış psöriatik artrit bulunmaktadır [19]. PsA'nın klinik belirtileri çeşitlidir: periferik artrit, aksiyal artrit, entezit, daktilit, deri ve tırnak hastalığı gibi semptomları içerebilir. Ayrıca, ön üveit ve bağırsak iltihabı gibi diğer tablolar da görülebilir [20]. PsA'lı hastalarda ciddi oranda artmış aterosklerotik kardiyovasküler hastalık riski ve metabolik sendrom, hipertansiyon ve hiperlipidemi gibi kalp hastalığıyla ilişkili çeşitli risk faktörleri de dahil olmak üzere hastalıkla ilişkili önemli morbidite bulunmaktadır [21].

NET'lerin romatoid artrit ve psöriazis patogenezinde rolü gösterilmiştir; bu hastalarda

sağlıklı kontrollere kıyasla periferik kanlarda daha yüksek miktarda NETotik hücre gözlenmiştir. Ancak, PsA'lı hastalarda NETozis gelişimi ve klinik bulgular arasındaki ilişki henüz çalışılmamıştır. Çalışmamızda, psöriatik artriti model olarak NET'lerin otoenflamatuvar hastalıklar üzerindeki etkisini araştırmayı hedefledik. Psöriaziste derideki patolojik enflamatuvar süreçlerin eklem hastalığının gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir. PsA'nın seyrinde, NET'in önemli bir etkisi olabileceğini düşünerek, PsA'lı hastaların nötrofillerinin RA'lı hastalar ve sağlıklı bireylere göre NET formasyonunu indükleme yeteneğini ve bunun hastalığın şiddeti ile ilişkisini incelemeyi planladık.

Aynı zamanda, PsA'lı hastalardan alınan serumların sağlıklı kişilerin nötrofilleri üzerinde NET degradasyon kabiliyetini belirlemek için, nötrofil hücre kültüründe oluşan NET'leri PsA'lı hastaların serumu ile 6 saat inkübe ederek çalıştık.

Bu çalışmalara ek olarak, serumda NET formasyonunu etkileyebilecek bir faktör olan Katelisin Antimikrobiyal Peptit 37 (LL-37) seviyeleri de ölçüldü. Daha önceki çalışmalarda otoenflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda önemli proenflamatuvar sitokinler olan İnterlökin (İL)-1 beta, tümör nekroze edici faktör (TNF)-alfa ve İL-8 düzeyleri ile NET formasyonu arasındaki ilişki çeşitli hastalıklarda çalışılmıştı ancak teorik olarak etkili olabileceğini düşündüğümüz bu faktör ve NETozis ilişkisi henüz PsA'da çalışılmamıştır.

Nötrofillerin çeşitli otoimmün hastalıklarda rol oynadığına dair önemli destekleyici kanıtlara rağmen, nötrofil düzensizliğini hedef alan terapötik stratejiler sınırlıdır. Nötrofil sayılarını veya önemli nötrofil fonksiyonlarını hedef alan immünosüpresif etkiler enfeksiyon duyarlılığını artırabilir. Bu nedenle, farmakolojik müdahaleler ideal olarak nötrofillerde spesifik olarak düzensiz fonksiyonları hedeflemeli ve diğer önemli antimikrobiyal fonksiyonları korumalıdır. NET formasyonunu engellemek, bu hastalıkların rolü ve nötrofillere özgü özelliklerinden dolayı çekici bir stratejidir. Bu çalışma sonucunda, PsA'nın gelişim mekanizmasını daha iyi anlayabileceğimizi, ileride kişiye özel tedavilerin planlanmasına katkıda bulunabileceğimizi ve gereksiz, çok yıpratıcı ve yüksek maliyetli tedavi denemelerinin önüne geçebileceğimizi düşünmekteyiz.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı ile Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı-Romatoloji Bilim Dalı'nın ortak çalışması olarak planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nötrofil Biyolojisi

Nötrofiller, insan dolaşımında en çok bulunan lökosit türüdür ve bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Nötrofiller, akut enflamatuvar yanıtta özellikle önemli roller üstlenirler ve çoğu mikroorganizmaya karşı hücresel savunmanın ilk hattını oluştururlar [22]. Homeostatik koşullarda, nötrofiller mikroorganizmaları tespit etmek için kanda ve birçok dokuda bulunur; ayrıca anjiyogenez, koagülasyon ve doku onarımı gibi çeşitli fizyolojik işlevlere de katkıda bulunurlar [23, 24].

Nötrofillerin incelenmesi çeşitli teknik zorluklar nedeniyle özellikle zor olmuştur. Diğer birçok hücre türünden farklı olarak, dolaşımdaki nötrofiller post-mitotik olduğundan, nötrofil popülasyonları *in vitro* ortamda genişletilemez. Nötrofillerin dolaşımdaki ömrü bir günden azdır; bu durum, karmaşık deneylerin zaman kısıtlamalarıyla karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır [25].

2.1.1. Nötrofil homeostazi

Sağlıklı koşullarda, nötrofiller kemik iliğinden kana salınır ve genellikle insanlarda ve farelerde bir günden kısa bir süre dolaşımda kalır; ancak bazı hücrelerin kanda birkaç gün kalabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır [26, 27]. Nötrofillerin kemik iliğinden salınması ve dokulara infiltre olması sirkadiyen frekansta gerçekleşir ve nötrofiller söz konusu olduğunda, kanda bulunma süreleri tüm ekstraselüler yaşamlarını temsil ettiği düşünülürken, örneğin lenfositler için kandaki varlığı normalde lenfoid organlar arasındaki bir geçişi temsil eder [28].

Kan dolaşımında bulundukları süre boyunca, nötrofillerin yüzey marker ifadesi ve protein yükü yaşlandıkça değişir, buna kemokin reseptörü CXCR4'ün hücre yüzeyi ifadesinin artması da dahildir. Bu kemokin reseptörü nötrofillerin dokulara infiltre olması ve dolaşımdan uzaklaştırılmasını sağlar [29]. Dalak, akciğerler ve karaciğer gibi çeşitli dokulara homeostazis koşullar altında infiltre olur [30]. Dokuda yerleşik nötrofiller muhtemelen mikroorganizmalara yanıt vermeye hazır nöbetçiler olarak işlev görürler. Örneğin farelerde, akciğer endotelinde bulunan büyük nötrofil popülasyonu, patojenlerin tespiti ve yok edilmesi

için bu dokuda savunma pozisyonu sağlayabilir [31]. Periferik dokulara gereksiz nötrofil infiltrasyonunu önlemek için, ekstrasvazasyon süreci sıkı bir şekilde düzenlenir ve nötrofiller ile enfekte dokudaki kan damarlarını kaplayan endotel arasında bir dizi düşük ve yüksek afiniteli adezyon etkileşimleri gerektirir [32].

Lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen 1 (LFA-1) integrin (CD11a/CD18) sıkı yapışmada çok önemli bir rol oynarken, Mac-1 integrin (CD11b/CD18) nötrofillerin göç için uygun bir bölge aramasına aracılık eder [33]. Şaşırtıcı bir şekilde, göç etmiş nötrofiller, sistemik enflamasyonun yayılmasına katkıda bulunduğu düşünülen bir süreç olan ters göç (ablüminalden lüminal yönde hareket) yoluyla potansiyel olarak dolaşıma yeniden girebilirler [34]. Adezyon moleküllerine ek olarak, homeostazın korunmasına yardımcı olan enflamatuvar süreç için negatif regülatörler de tanımlanmıştır. Lökosit adezyon kaskadının yeni tanımlanan endojen inhibitörleri arasında Del-1(Gelişimsel endotelyal lokus-1), pentraksin 3 ve büyüme farklılaşma faktörü 15 yer alır [35]. Aslında, nötrofil ekstrasvazasyonunu teşvik etmek için LFA-1 ile etkileşime giren ICAM-1'in aksine Del-1, nötrofillerin LFA-1'e bağımlı endotelyal yapışmasını baskılar [36].

2.1.2. Nötrofil heterojenitesi

Nötrofiller hastalıklarda karmaşık bir rol oynarlar, hastalık ilerlemesini hem destekleme hem de engelleme yeteneğine sahiptirler. Tümörü teşvik eden sitokinlerin salgılanması, tümör anjiyogenezinin artırılması, hücre dışı matriksin modülasyonu, tümör hücrelerinin yayılmasının desteklenmesi ve antitümör immün yanıtlarının baskılanması yoluyla tümör büyümesini ve metastatik ilerlemeyi destekleyebilirler [37, 38]. Bununla birlikte nötrofiller ayrıca doğrudan sitotoksiste, antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksiste ve adaptif anti-tümör immünitesini indükleyerek tümör büyümesini ve metastatik ilerlemeyi de sınırlayabilir [39, 40]. Nötrofillerin hastalıklarda hem hastalıkları teşvik eden hem de baskılayan çift taraflı rolü, araştırmacıların dikkatini çekmiştir; son yapılan çalışmalar, kanda veya dokularda farklı işlevlere sahip farklı nötrofil alt kümelerinin varlığını vurgulamaktadır [30, 41].

Nötrofiller, tarihsel olarak, fiziksel özellikleri nedeniyle “yüksek yoğunluklu nötrofiller (HDN) ve düşük yoğunluklu nötrofiller (LDN)” olarak tanımlanmıştır [42, 43].

Genel olarak, LDN'lerin az miktarda granül enzimi içeren immatür nötrofiller olduğu, HDN'lerin ise daha yüksek düzeyde granül enzimi içeren matür nötrofiller olduğu kabul edilir [30, 44]. LDN'ler patojenik bir fenotip ve işlevlere sahiptir. Örneğin, LDN'ler tip I interferonlar da dahil olmak üzere bazı sitokinleri daha yüksek seviyelerde üretirler; vaskülopatik ve immün sistemi uyarıcı özelliklere sahip NET oluşumunun artmasına eğilimlidirler [45].

“Prenötrofiller” olarak adlandırılan bir proliferatif prekürsör, sırayla çoğalmayan immatür ve matür nötrofillere farklılaşır. Prenötrofiller CD177'yi eksprese ederken, C-X-C kemokin reseptörü 4 (CXCR4), CXCR2 ve CD101'in diferansiyel ekspresyonu, immatür nötrofiller (CXCR2–CD101–) ve matür nötrofiller (CXCR2+CD101+) arasında ayırım yapılmasına izin verir [46].

Son zamanlarda, sağlıklı insanlar ve farelerdeki nötrofil alt popülasyonları arasında, tip I interferonla uyarılan genleri (ISG'ler) daha yüksek düzeyde ifade eden bir nötrofil alt kümesi de dahil olmak üzere diğer alt gruplar tanımlanmıştır. Bu interferona duyarlı nötrofil alt kümesinin fizyolojik ve patojenik rolleri henüz belirlenmemiş olmasına rağmen, enfeksiyonlarla daha etkili bir şekilde başa çıkabilen ve kanda hazır bulunan hücreleri temsil etmeleri muhtemeldir. Ancak, bu tür nötrofil alt gruplarının kemik iliğinde epigenetik olarak mı oluştuğu yoksa periferdeki belirli uyarıcılara maruz kalmanın bir sonucu mu olduğu henüz bilinmemektedir [47, 48].

2.1.3. Nötrofil aktivasyonu ve efektör fonksiyonları

Endotel bariyerini aştığında nötrofil kendisini oldukça farklı bir enflamatuvar ortamda bulur. Nötrofil interstisyel alanda mikropalara doğru kemotaktik gradyanı takip ederek İL-8 gibi konakçı tarafından üretilen sitokinleri ve paralel olarak patojen kaynaklı kemoatraktanları (örneğin, fMLP (formilmetyonin lösil fenilalanine)) takip eder. Bu süreçte, bu kemoatraktanlar, MAPK/ERK yolunun sinyalizasyon zincirini başlatan ilgili nötrofil reseptörlerine (sıklıkla G proteinine bağlı reseptörler) bağlanır [49, 50]. Aşağı yöndeki moleküller, nötrofil aktivasyonunun bir işareti olan oksidatif patlama mekanizmasının birleşimini hızlandırır. Ayrıca, FPR1'in uyarılması, purinerjik reseptörlerin aktivasyonunu başlatarak ATP'nin salınmasını tetikler; bu da fonksiyonel yanıtların başlatılmasında kritik bir rol oynar [51].

Nötrofillerin kemoatraktanların giderek artan konsantrasyonlarına doğru hareket etmeleri, bu süreçte kilit öneme sahiptir; çünkü İL-8 gibi kemoatraktanlar, farklı konsantrasyonlarda, nötrofil fizyolojisi üzerinde çok çeşitli etkilere sahip olabilir: örneğin, İL-8 düşük konsantrasyonlarda, L-selektin ve $\beta 2$ integrinlerin ekspresyonunu uyarırken, biraz daha yüksek konsantrasyonlar oksidatif patlamaya yol açar, çok yüksek konsantrasyonlarda ise nötrofillerin degranülasyonunu tetikler [52]. Ayrıca birçok kemoatraktan molekül bir hazırlama etkisi gösterir. Yani, tek başlarına oksidatif tepkiyi hafifçe uyarırken, diğer uyarıcılara verilen sonraki tepkiyi önemli ölçüde artırır. Bu fenomenin bir örneği, lipopolisakkaritin (LPS) fMLP yanıtı üzerindeki güçlü tetikleyici etkisidir [53]. Bu durumda, nötrofilin LPS'ye maruz kalması, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz mekanizmasının membran üzerinde birleşmesine yol açar [54]. Nötrofiller fagositoz, degranülasyon, sitokinler üretimi ve NETozis gibi programlarını yürütmeye başlarlar.

Mikroorganizmaları öldürmenin merkezi bir bileşeni, onların nötrofil fagozomlarına alınması, fagozomların hücre içi lizozomlarla füzyonu ile oluşan ve patojenleri kontrollü koşullar altında parçalayabilen fagolizozomlar oluşturulmasıdır. Nötrofillerin hücre içi vezikülleri, fagolizozoma salınmaya hazır çeşitli sitotoksik enzimler, proteinler ve peptitler içerir [55]. Nötrofil tepkisinin başka bir bileşeni, reaktif oksijen türleri (ROS) yoluyla bir solunum patlaması oluşturan ve birçok yapıyı tahrip edebilen oldukça reaktif süperoksit anyonları yaratan NADPH oksidaz mekanizmasının aktivasyonudur [56].

Nötrofiller, çoğunlukla proenflamatuvar/antienflamatuvar sitokinler, kemokinler, immün regülatör sitokinler, TNF süper ailesi üyeleri ve anjiyojenik/fibrojenik faktörler dahil olmak üzere çeşitli sitokinler eksprese ederler. Nötrofillerin sitokin üretme yeteneği; antiviral savunma, hematopoez, anjiyogenezi ve fibroenez gibi süreçler üzerinde önemli etkilere sahiptir [57].

Nötrofiller B hücresi olgunlaşması, fonksiyonu ve hayatta kalması için kritik olan B Hücre Aktive Edici Faktör'ün (BAFF) ve proliferasyonu indükleyen ligandın (APRIL) ana kaynağıdır [58].

Nötrofiller tarafından üretilen kemokinler, enflamasyon bölgelerine belirli hücre popülasyonlarını seçici olarak kendilerine çekme yeteneklerinin yanı sıra B ve T hücre gelişiminin düzenlenmesinde rol aldıkları için de önemlidir [59, 60].

İnsan ve fare nötrofilleri, aktive olduklarında potansiyel olarak İL-8, CXCL1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, monosit kemotaktik proteini-1 (MCP-1/CCL2), makrofaj enflamatuvar proteini-1 α (MIP-1 α /CCL3) dahil olmak üzere çeşitli kemokinler üretebilirler [59]. Nötrofiller tarafından üretilen kemokinler öncelikle monositler, dendritik hücreler (DC), doğal öldürücü (NK) hücreler ve yardımcı T lenfosit (Th)-1 ve Th17 hücreler için kemotaktiktir [61].

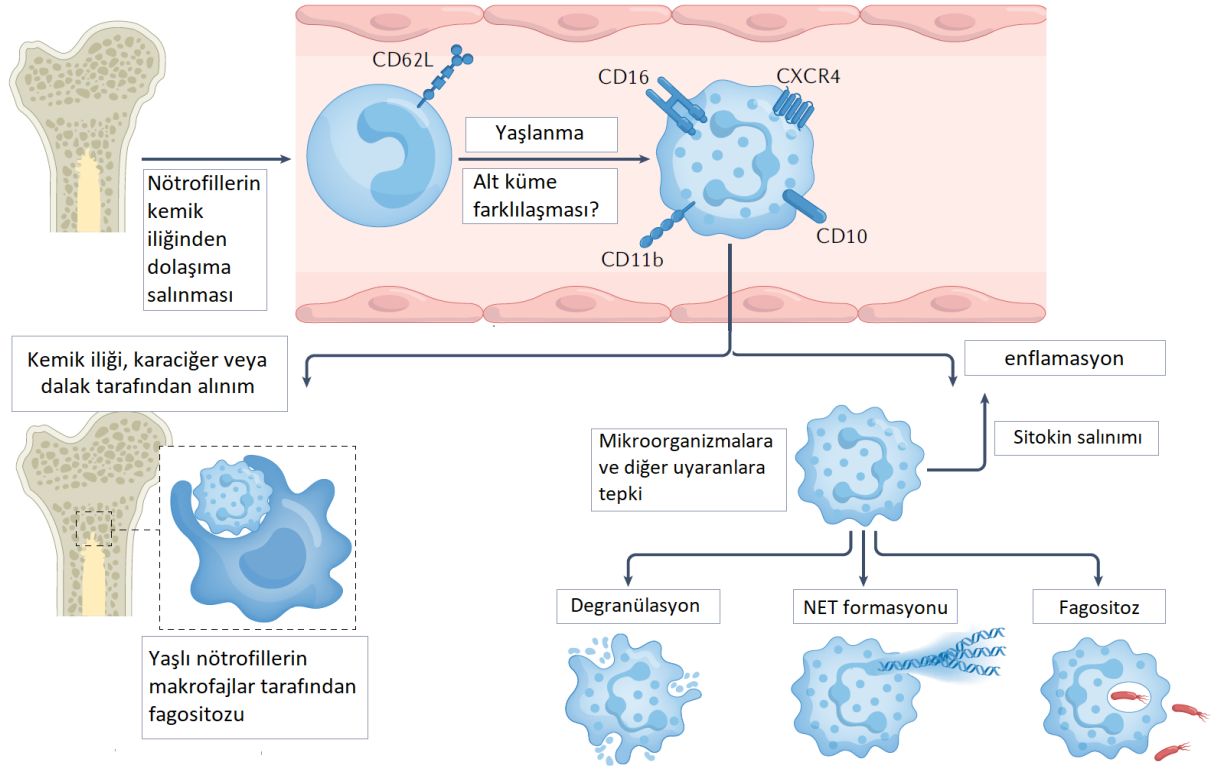
Nötrofiller, çok sayıda tehlikeli maddeyi kan dolaşımı yoluyla güvenli bir şekilde taşıma ve daha sonra bunları uygun zamanda doğru şekilde dağıtma görevi de görürler. Nötrofil granülleri nötrofillerin benzersiz ihtiyaçlarını karşılayan özel olarak ayarlanmış protein ve enzimler ile doludur: Azurofilik granüller (aynı zamanda “peroksidaz pozitif veya birincil granüller” olarak da bilinir) en büyükleri olup oksidatif patlamada kritik bir enzim olan MPO, defensinler, lizozim, bakterisidal/geçirgenliği artıran protein (BPI), NE, PR3 ve bir dizi katepsin G (CG) içerir [62, 63].

Bu granüller antimikrobiyal bileşiklerle dolu olup nötrofillerin moleküler silahları için birincil depo görevi görür. İkinci sınıf granüller olan “spesifik (veya ikincil) granüller” ise daha küçüktür, MPO içermez ve glikoprotein laktoferrin içerikleri ile karakterize edilir [63].

Bir nötrofil aktivasyon yoluyla ilerledikçe, granüller harekete geçirilir ve plazma membranı ya da fagozom ile birleşerek içeriklerini ilgili ortama salarlar [64].

Bu yanıtlar, homeostazı korumak için potansiyel olarak zararlı mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasında yararlı roller üstlenir, ancak nötrofillerin düzensiz aktivasyonu, dokularda ciddi hasara ve diğer immün hücrelerinin toplanmasına neden olarak enflamasyon döngüsünü tetikleyebilir.

Nötrofillerin yaşam döngüsü ve fonksiyonları Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Nötrofillerin yaşam döngüsü ve fonksiyonları [25]

2.2. Nötrofil Ekstraselüler Tuzakları

NET'ler ilk olarak Takei ve arkadaşları tarafından (1996) nekroz veya apoptozdan farklı bir hücre ölüm şekli olarak fark edilmiş ve nötrofillerin bakterileri öldürmek için hücre dışı yapılar olan NET'ler oluşturduğu gösterilmiştir [2].

NET oluşumu süreci sonunda gelişen olaylar bilahare daha fazla çalışılmış ve 2004 yılında “NETozis” olarak adlandırılmıştır [4]. NETozis'te, nötrofiller doğal bağışıklık sensörlerinin uyarılması üzerine, mikroorganizmaları yakalayan kromatinlerini NE ve MPO gibi enzimler ve antimikrobiyal peptidlerle birlikte hücre dışı ortama salarlar. Nötrofil bilinen en viskoz yapılardan biri olan deoksiribonükleik asidi (DNA) hücre dışı ortama salar ve etrafında ne varsa fiks eder. Patojenler NET'lerde bulunan antimikrobiyal maddelerin toksisitesi nedeniyle öldürülür veya diğer nötrofiller ve makrofajlar tarafından fagositozu kolaylaştırmak için hareketsiz hale getirilir [65]. NET'ler bakterileri, mantarları, virüsleri ve parazitleri yakalar, nötralize eder ve öldürür [66-69].

NET'lerin mikrobisidal potansiyelinde; NE, MPO, katepsin G, laktoferrin, pentaksiran 3,

kalprotektin, katelisidinler, defensinler, laktoferrin, jelatinaz, PR3 ve peptidoglikan bağlanma proteinleri rol oynamaktadır (Çizelge 2.1) [3, 4].

Çizelge 2.1. Nötrofil ekstraselüler tuzak yapısının ana proteinleri

Kökeni	Protein türü
Nükleer içerik	DNA, Histonlar (H1, H2A, H2B, H3, H4)
Birincil (azurofilik) granüller	NE, MPO, Katepsin G, Defensinler (İnsan nötrofil peptidleri: HNP-1, HNP-2, HNP-3), Bakteriyel geçirgenliği artırıcı protein (BPI)
İkincil (spesifik) granüller	Alkalın Fosfataz, Laktoferrin, Lizozim, NADPH oksidaz Katelisidin, Kolajenaz, Pentraksin
Üçüncül granüller	Katepsin, Jelatinaz [Matriks metaloproteinaz 9 (MMP9)]
Sitozol	Proteinaz 3 (PR3), Triptaz, Nötrofil serin proteaz 4 (NSP4), Kalprotektin, Katalaz

Gram pozitif ve negatif bakteriler ile mantarlar NETozis'i tetikledikten sonra NET'lerde durdurulurlar [70, 71]. Başka NETozis indükleyicileri de tanımlanmıştır. Bunlar arasında lipopolisakkarit (LPS), sigara dumanı, İL-6, İL-8, İL-1beta, gibi enflamatuvar sitokinler, otoantikorlar, urat kristalleri, hidrojen peroksit, iyonoforlar, kompleman peptitleri ve immünoglobülin (Ig)A bulunmaktadır [11, 72-80]. *In vitro* çalışmalar için, sinyal iletim enzimi protein kinaz C'nin (PKC) bir aktivatörü olan PMA, bir NETozis indükleyicisi olarak kullanılır [81].

Nötrofil ekstraselüler tuzak formasyonu tetikleyenler Çizelge 2.2'de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Nötrofil ekstraselüler tuzak formasyonu tetikleyenler

İndükleyici	Reseptörler	İlgili Proteinler
İmmün kompleksler	FcR ve CR	mitoROS
PMA	PKC	MPO, NE, RIPK1, MEK, ERK, AKT, PI3K, mTOR, DEK
MSU Kristaller	P2Y6 Membran kararsızlığı	MPO, RIPK1, RIPK3, NOX2, NE
Ca ²⁺ Kristalleri	CXCR2 Membran kararsızlığı	PAD4
Parazitler	TLR2, TLR4	JNK, NOX2
Mantarlar	CR3, Dektin 2	MPO, NOX2, NE
Virüsler	TLR7, TLR8	MPO, NOX2, NE
Bakteriler/LPS	TLR2, TLR4, PSGL1, RAGE	PAD4, NOX2, MPO, NE, HMGB1
Sitokinler ve Kemokinler	İnterferon reseptörü CXCR1, CXCR2	JAK, STAT
A23187	iCa ²⁺	Kalsinurin, PAD4

2.2.1. NET formasyonu

NET formasyonu “intihara meyilli NETozis (suicidal NETozis)” ve “yaşamsal NETozis (vital NETozis)” olarak iki şekilde ortaya çıkabilir (Şekil 2.2) [77, 82]. **İntihara meyilli NETozis** sürecinde, nötrofiller aktinlerini depolarize ederler, nükleer membran parçalanır ve kromatin sitoplazmada granül bileşenleriyle birleştirilir, plazma membranı permeabilize olur ve NET'ler nötrofil aktivasyonundan 3-8 saat sonra hücre dışı ortama salınır. Bu mekanizma nötrofillerin ölümüne neden olduğu için intihara meyilli NETozis terimi kullanılır [70 ,83]. **Yaşamsal NETozis** olarak adlandırılan mekanizmada ise nötrofiller mikroorganizmaya maruz kaldığında hücre ölümüne yol açmadan dakikalar içinde hızlı bir şekilde NET salınmasına neden olur. Yaşamsal NETozis nötrofillerin Patojen ilişkili Moleküler Paternler (PAMP'ler) veya Hasarla ilişkili Moleküler Paternler (DAMP'ler) olarak adlandırılan spesifik mikrobiyal moleküler tarafından aktive edildiğinde gerçekleşir. Örneğin, LPS hücre lizisine neden olmadan hızlı NET salınımına yol açabilir [82].

İntihara meyilli NETozis

İntihara meyilli NETozis, Fc, kompleman veya sitokin reseptörlerden gelen sinyaller ile tetiklenir [83]. Bu reseptörler aktive edildiğinde, endoplazmik retikulum içinde tutulan kalsiyumun sitoplazmaya salınır. Sitoplazmada kalsiyum düzeyinin artması, PKC veya mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yollarının aktivasyonu ve süperoksit üreten NADPH oksidaz alt birimi olan glikoprotein fagositik oksidaz 91'in (gp91^{phox}) fosforilasyonunu artırarak NADPH oksidazın alt birimlerinin birleşmesini başlatır ve fagozomal membranlarda fonksiyonel kompleksler oluşur [84, 85].

NETozis'in ROS aracılı yolu, NADPH oksidaz ve NE enzimlerini gerektirir. Klasik intihara meyilli NETozis yolunda ROS'un önemli bir oyuncu olduğuna dair kanıtlar, esas olarak iki farklı gözlemden ortaya çıkmıştır. ROS üretemeyen kronik granüloamatöz (CGD) hastalığı olan hastalardan alınan nötrofiller, *Staphylococcus aureus* veya PMA'ya maruz kaldığında NET'leri serbest bırakamazlar. Ayrıca, N-asetilsistein veya troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) gibi ROS inhibitörleri NETozis inhibisyonuna neden olur [77].

NADPH oksidaz yoluyla üretilen ROS, granüllerin ve nükleer membranın parçalanmasına neden olur. ROS ayrıca MPO enzimini uyarır. MPO azurofilik granüllerin membranında bulunan NE enzimin tetiklemesini ve çekirdeğe translokasyonunu tetikler. NE çekirdeğe girmeden önce sitoplazmadaki F aktin filamentlerine bağlanır ve onları degrade eder. Aktin filamentlerinin degrade edilmesiyle hücre mobilizasyonu durur ve hücre nispeten stabil (dengeli) hale gelir; fagositoz da engellenir [85].

NE ve MPO çekirdeğe hareket eder. NE, linker histon H1'i parçalar ve core histonları işleyerek kromatin dekonenzasyonuna neden olur. Daha sonra MPO, kromatine bağlanır ve enzimatik aktivitesinden bağımsız olarak NE ile sinerji oluşturarak kromatinin dekonenzasyonunu sağlar. Nükleer membranda porlar genişler, geçirgenlik artar. Kromatin sitoplazmaya geçer ve sitoplazmada açığa çıkmış AMP'lere kaplanır, hücre membranı parçalanmaya başlar ve sonuçta plazma zarının yıkımıyla NET serbest bırakılır [86].

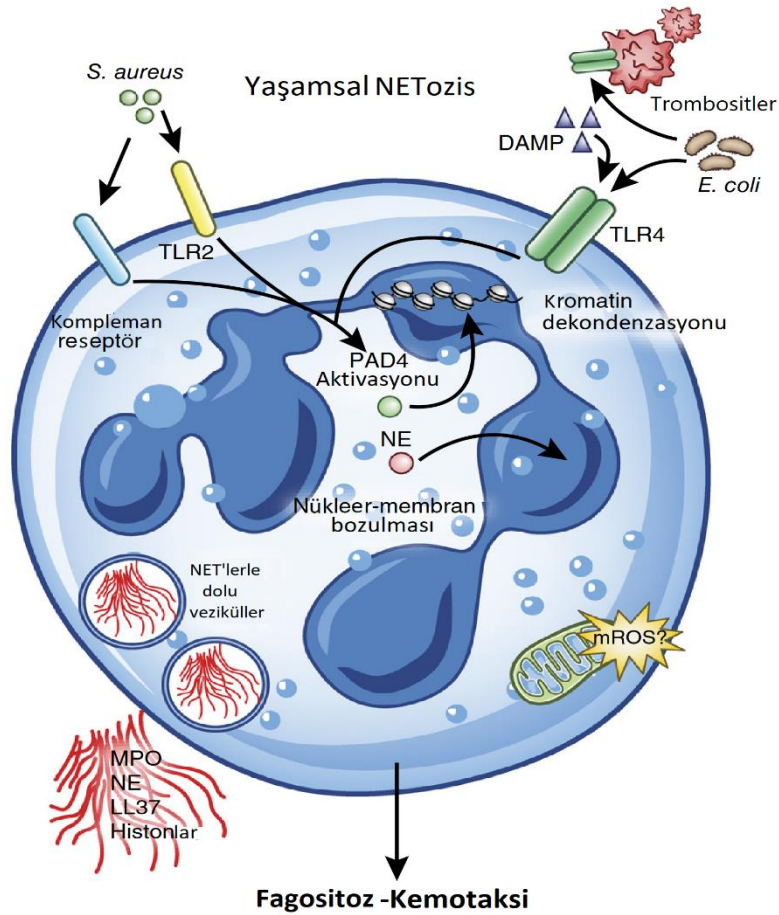
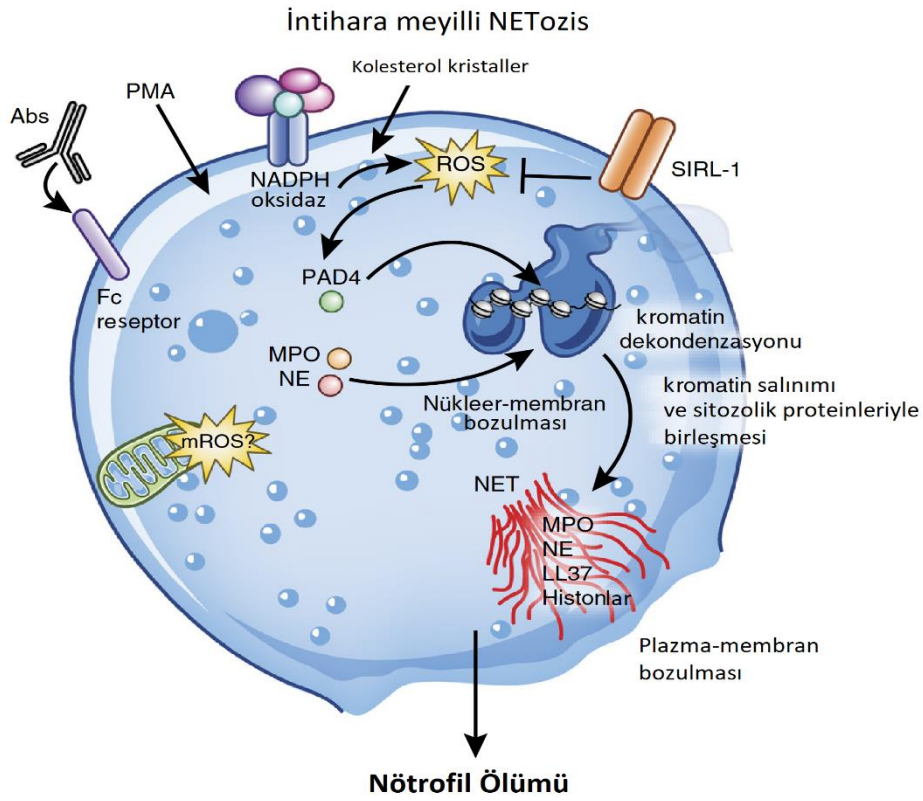
NADPH oksidaz, başka bir önemli enzim olan peptidil arginin deiminaz tip 4 (PAD4)'ün, aktivasyonuna da neden olur. PAD4, histonlar üzerinde bulunan arjininleri sitriline dönüştürerek onların deaminasyonuna yol açar ve nötrofil çekirdeğinde kromatin

dekondenzasyonuna katkıda bulunur. PAD4, hidrojen peroksit tarafından yeterince aktive edilebilir [87, 88]. PAD4 eksikliği olan fare nötrofilleri, LPS ve TNF ile uyarıldıklarında NET'leri serbest bırakamazlar [89].

Yaşamsal NETozis

Pilsczek ve arkadaşları nötrofillerin *Staphylococcus aureus*'a yanıt olarak hücre ölümüne uğramadan hızlı bir şekilde NET'leri serbest bırakabildiğini gösterdi. Serbest kalan DNA yapılarının hücrenin dışında olduğunu ve nötrofillerin canlı kaldığını göstermek için hücreyi geçirmeyen bir DNA boyası olan SYTOX Green'i kullandılar. Nötrofillerden NET salınımının hücre içi DNA boyası SYTOX Green'in hücreye nüfuz etmeden devam ettiğini bildirdiler. Bu sonuç, nötrofillerin hücre zarı bütünlüğünü koruyarak NET salınımı yapabildiğini, yani hücre ölmeden DNA'nın serbest bırakıldığını ve NETozis'in alternatif bir yolla meydana gelebileceğini öne süren kanıttı [70, 90]. Yaşamsal NETozis *Staphylococcus aureus*'un *in vitro* ve *in vivo* olarak indüklediği NET'lerin elektron mikroskopi görüntüleri ile de desteklenmiştir [91]. Hücre parçalanması olmadan mitokondriyal DNA'nın salınması ilk önce eozinofillerde, ardından nötrofillerde rapor edilmiştir, buna “mancınık benzeri NETozis (Catapult-like NETosis)” adı verilmiştir [92, 93].

Yaşamsal NETozis, nötrofiller PAMP'ler veya DAMP'ler olarak adlandırılan mikrobiyal spesifik moleküler tarafından aktive edildiği gerçekleşir. Örneğin LPS, Toll benzeri reseptör (TLR)4'e bağlanarak hücre lizisine neden olmadan NET salınımına yol açabilir. NET salınımından sonra nötrofiller hayatta kalır ve kemotaksi, fagositoz ve bakterilerin öldürülmesi gibi konak cevabındaki diğer işlevlerini yerine getirebilirler [94]. Litik NET oluşumu süreciyle karşılaştırıldığında, yaşamsal NET oluşumu, NADPH oksidaz yolundan bağımsız olarak hızlı NET oluşumuna yol açar. DNA vezikülleri nükleer membrandan çıktıktan sonra, sitoplazmadan geçer ve plazma membranıyla birleşir, böylece membranın delinmesine gerek kalmadan NET'in hücre dışına taşınması sağlanır [95]. Yaşamsal NET oluşumunda, PAD4 aktivasyonu kromatin dekondenzasyonunu kolaylaştırır ve nötrofil elastazın çekirdeğe translokasyonuna katkıda bulunur. Kromatin, plazma membranı bozulması olmadan nükleer membran kabarması ve veziküller aracılığıyla hücreden salınır [96]. Bu büyük vakuollerin nasıl salındığı bilinmemekle birlikte, nötrofillerin, bu tür NET oluşumundan sonra kemotaksi, fagositoz, oksidan üretme ve yutulan patojenleri öldürme yeteneklerini korudukları açıktır [82].



Şekil 2.2. Nötrofil ekstraselüler tuzak formasyon mekanizmaları [96]

2.2.2. NETozis regülasyonu (düzenlenmesi)

Düzensiz NET salınımı bağışıklıkla ilişkili hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilir, bu nedenle NETozis sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Mikroorganizmaların boyutu, NETozis'i etkileyen önemli bir faktördür. Patojen boyutu, NETozis ve fagositoz arasındaki rekabetin başarısını belirler. Bu mekanizma, NET'lerin tercihan büyük mikroorganizmalara karşı salınmasını sağlar. Küçük mikroorganizmalar fagozoma alınır ve azurofilik granüllerin fagozomla hızlı füzyonunu teşvik eder. Bu mekanizma başladığında NE çekirdekten uzaklaştırılır ve kromatin dekonduksiyonu engellenir. Nötrofillerde, yutulamayacak kadar büyük mikroorganizmalara bağlanan fagozomların yokluğu, NE'nin membran füzyonunu içermeyen alternatif bir yol ile yavaş yavaş sitozole salınmasına ve NETozis'i başlatmasına izin verir. Antifungal fagositik reseptör dektin-1'den gelen sinyaller fagositozu tetiklerken NETozis'i inhibe eder. Antifungal fagositik reseptör dektin 1'den yoksun fareler, NETozis'i regüle edemez ve küçük mikroorganizmalara yanıt olarak NET aracılı patolojiye duyarlıdırlar [97].

NETozis'in seçici indüksiyonu, enfeksiyon sırasında hücre içinde ortadan kalkabilecek kadar önemsiz ve küçük patojenlerin neden olduğu gereksiz NET oluşumunu ve doku hasarını sınırlar.

Partikül boyutunun NETozis üzerindeki etkisi DAMP'lar için de geçerlidir. Daha büyük urat kristalleri, yutulabilecek kadar küçük olan urat kristallerinden daha güçlü bir şekilde NETozis'i tetikler [98].

Virülan enteropatojenik bakteriler NET oluşumunu indüklerken virülan olmayan probiyotik bakteriler NET salınmasına neden olmaz, örneğin *Lactobacillus rhamnosus* GG suşu, hem PMA hem de *Staphylococcus aureus* kaynaklı NET oluşumunu inhibe eder [99].

Flagella içermeyen bakteriler, güçlü bir ROS patlaması ve NETozis ortaya çıkarmada başarısız olur, ancak flagella tek başına NETozis'i indüklemek için yeterli değildir [100].

Bununla birlikte, flagellanın konakçı hücre biyolojisini değiştirdiği de bilinmektedir. NE'nin çekirdeğe translokasyonunu güçlendirip güçlendiremeyeceğini ve nasıl güçlendirebileceğini araştırmak ilginç olacaktır.

NETozis ayrıca metabolik yollar aracılığıyla da modüle edilir, örneğin NET'leri tetiklemek için kritik olan NADPH seviyelerini düzenleyen metabolik yollar bulunmaktadır [35].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, fosfofruktokinaz-1 (PFKL), nötrofillerde glikolizi modüle ederek NADPH seviyelerini, NADPH oksidaza bağımlı ROS üretimini ve NETozis'i negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir. Nötrofiller uyarıldığında PKC aktivasyonu, NET'lerin salınımını tam olarak devreye sokmak için PFKL aktivitesini inhibe eder [101].

Ek olarak mikroorganizmalar, nötrofil aktivasyonunu baskılayan konakçı reseptörlerini devreye sokarak NETozis'i zayıflatır [102]. Grup A ve B streptokoklar, ROS patlamasını ve NETozis'i azaltmak için sialik asitlere benzeyen moleküller kullanır. Benzer şekilde, *Pseudomonas aeruginosa* kendi yüzeyini konakçı siyalilenmiş glikoproteinlerle kaplayarak Siglec-9 yoluyla NETozis'i baskılar [103].

2.2.3. NET'lerin mikroplara karşı savunmada rolü

NETozis sürecinde rol alan proteinlerin çoğunun fagositoz ve sitokin regülasyonu için de önemli olduğu göz önüne alındığında, NET'lerin immün savunmaya spesifik katkısını tanımlamak zor olmuştur. Ancak, yapılan araştırmalar, NET'lerin birçok mikrop türüne karşı etkili olabileceğini göstermektedir. Bir enfeksiyon sırasında, NET'ler bakteri, mantar ve protozoa dahil olmak üzere çok çeşitli mikropları öldürebilir, böylece mikrobiyal patojenlerin yayılmasını önleyebilir. Özellikle mantar enfeksiyonları ve nötrofil antimikrobiyal stratejilerini bozabilecek virülan bakterilere karşı NET'lerin kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak, NET'lerin öldürme yetenekleri halen tartışmalıdır ve bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

NETozis'in mikroorganizma boyutuna bağımlılığı, NET'lerin rolünü fagositozdan bağımsız olarak incelememizi sağlar. Verilere göre nötrofiller, filamentöz *Candida albicans* gibi büyük patojenlere yanıt olarak seçici bir şekilde NET'leri serbest bırakır. Ancak ilginç bir şekilde, *C. albicans*'ın maya formu NETozis'i tetikleyememiştir. Dektin-1'in yolu ile fagositoz, NE'nin çekirdeğe translokasyonunu azaltarak NET salınımını önler [97].

İnsanlarda MPO eksikliği, ağırlıklı olarak tekrarlayan mantar enfeksiyonlarına yol açar [104]. *C. albicans*, antibiyotik tedavisi gören, pankreatit veya böbrek yetmezliği olan veya

mide-bağırsak ameliyatı geçiren hastalar gibi bağışıklık sistemi zayıf kişilerde hastalığa neden olur. *C. albicans*'ın epitel hücreleri ve makrofajlar tarafından tanınması, nötrofilleri çeken kemokinlerin salınmasını sağlar. Nötrofiller, NET'leri serbest bırakarak hif formunda olan *C. albicans*'ı yakalayabilir ve ortadan kaldırabilir. Hızlı bir NETozis yanıtını başarmak için β -glukan kompleman reseptör 3 (CR3) tarafından tanınmalı ve hücre dışı matriksin bir bileşeni olan fibronektin mevcut olmalıdır [105].

NET'lerin seçici bir antimikrobiyal rolü ile tutarlı olarak, NET eksikliği olan Papillon-Lefèvre sendromlu hastalar piyojenik enfeksiyonlara duyarlılık gösterir ancak bu hastaların nötrofillerinde bakteri öldürme yeteneğinde bir kusur yoktur [106].

Shigella flexneri, epitel hücrelerini enfekte eden ve konakçıda dizanteriye neden olabilen enteropatojenik bir bakteridir. Bunun sonucunda, enfekte olmuş hücrelerde nükleer faktör kapp B (NF- κ B) aktive edilir ve nötrofilleri enfekte dokulara çekmek için İL-8 üretmesine neden olur. Bu süreçte, nötrofil türevi elastaz, mikrobiyal virülans faktörlerini bozar. *Shigella flexneri*, *in vitro* olarak NET'lerde tutulur ve DNA ile ilişkili NE, virülans faktörleri olan IcsA ve IpaB'yi parçalama yeteneğine sahiptir [107].

PAD4 eksikliği olan farelerde NETozis olmaması, polimikrobiyal sepsis veya *Burkholderia pseudomallei*'nin neden olduğu sepsiste bakteriyemiye ve sağ kalımı etkilemez, ancak PAD4 eksikliği olan nötrofillerde *Shigella flexneri* ve grup A streptokların kusurlu şekilde öldürüldüğü bildirilmiştir [87, 108]. Birçok parazit *in vitro* NETozis'i tetikler, ancak NET'lerin bu patojenlere karşı koruma sağlayıp sağlamadığı açık değildir [4].

İnsanda solunum sisteminde bulunabilen *Streptococcus pneumoniae*, NET indüksiyonundaki rolü iyi belirlenmiş bir Gram pozitif bakteridir. *S. pneumoniae*, NET'lerde sıkışıp kaldıktan sonra DNA'yı sindiren ve NET'lerden kaçmasına izin veren endA gibi virülans faktörleri üretebilir. Bu olay bakterinin üst solunum yollarından akciğerlere ve daha sonra kan dolaşımına yayılmasına izin verir [109].

TLR7 ve TLR8 reseptörleri HIV-1'den türetilmiş nükleik asitlerin tanınmasına yardımcı olur. Daha sonra NET oluşumunu teşvik etmek için ROS'u serbest bırakırlar. NET yapıları HIV'yi yakalayabilir, kontrol altına alabilir ve ortadan kaldırabilir. HIV, bir evazyon mekanizması olarak DC'ler tarafından İL-10 üretimini artırır, bu da ROS ve NET salınımını

engeller [110].

PAD4 aracılı NET oluşumu, influenza enfeksiyonuna karşı bağışıklık için gerekli değildir. Tutarlı bir şekilde, PAD4 eksikliği olan hayvanlar, influenza virüsüne karşı artan duyarlılık göstermez [111]. Özellikle vahşi tip farelerde (wild-type mice) influenza virüsü enfeksiyonunda veya *S. pneumoniae* enfeksiyonunda NET'ler bulunmamaktadır [112].

2.2.4. NET'lerin doku hasarındaki rolü

NET'lerin dokulara zarar verme yeteneği enfeksiyonda iyi anlaşılmıştır. NET'ler epitel ve endotel hücrelerini doğrudan öldürür ve aşırı NETozis, pulmoner mantar enfeksiyonunda epitele ve transfüzyona bağlı akut akciğer hasarında (transfusion-related acute lung injury - TRALI) endotele zarar verir [6, 13].

NET'ler ayrıca metisiline dirençli *S. aureus* sepsisi sırasında gelişen karaciğer hasarıyla da bağlantılıdır [112]. NET'lerin sunduğu zayıf korumayla birlikte, bu gözlemler NET'lerin bakteriyel sepsiste ağırlıklı olarak zararlı bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Sepsiste ve akut yaralanmada, dolaşımdaki serbest histonlar, hücre membranının bütünlüğünü tehlikeye atma yetenekleri nedeniyle sitotoksiktir [113, 114].

Antikor aracılı nötralizasyon çalışmaları, NET'e bağlı histonların NET aracılı sitotoksitede merkezi bir rolü olduğunu öne sürmektedir ancak nötrofillerin ve NET'lerin sepsiste doğrudan serbest histon kaynağı olup olmadığı belirsizdir [6].

NET'te bulunan defensinler gibi proteinler, ökaryotik hücrelerin geçirgenliğini artırır ve NE hücre bağlantılarını bozan hücre dışı matriks proteinlerini hedefler [115,116].

Deoksiribonükleaz (DNaz), kronik enflamasyon sırasında NET patolojisini bloke etmede etkilidir [116]. Benzer şekilde, DNaz tedavisi ve benzer bir ölçüde PAD4 inhibisyonu, NET ile ilişkili sitriline histonları azaltır ve immün hücre infiltrasyonu ve iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilişkili karaciğer hasarını en aza indirir [117, 118].

Kistik fibrozlu hastalarının akciğerleri, mikrobiyal kolonizasyonu ve kronik enflamasyonu teşvik ederek doku hasarına yol açan yapışkan ve yoğun mukus üretir. Akciğerde birikmiş

mukus NET, NE, MPO ve diğer nötrofil proteinlerini içerebilir [119].

Balgam viskozitesini azaltmaya yönelik bir tedavi, rekombinant DNaz'ın uygulanmasıdır. Bu hücre dışı DNA'nın balgam viskozitesine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir [120].

Klinik çalışmalarda, NE inhibitörleri olan serum lökosit proteaz inhibitörü (SLPI) ve α 1-antitripsin (A1AT), pulmoner NE aktivitesini azaltır ve hastalar için faydalı olabilir [121].

Kistik fibrozlu hastaların akciğerleri genellikle *Pseudomonas aeruginosa* ile kolonize olur. Bu hastalarda NET oluşumunu neyin tetiklediği bilinmemekle birlikte *Pseudomonas aeruginosa* güçlü bir NETozis indükleyicisidir. NET'ler, laboratuvar suşlarını ortadan kaldırmasına rağmen, bu patojenin klinik izolatları NET aracılı öldürmeye dirençli olabilir [122, 123]. NET'lerin dokuya zarar verme kapasitesi, NETozis'in neden daha az zararlı stratejilerle temizlenemeyen enfeksiyonlarla sınırlı olabileceğini açıklıyor.

Dolaşımda oluşan NET'ler, kanser ve obezite hastalarında derin ven trombozunu (DVT) destekleyebilir. NET'lerin trombozda rolü, DNaz tedavisinin ve PAD4 inhibitörlerinin farelerde DVT'yi engellediği bulgusuyla desteklenmektedir [124].

Tromboz sırasında NET oluşumu, endotelden hipoksi ile indüklenen von Willebrand faktörü (VWF) ve P-selektin salınımı ile başlatıldığı düşünülmektedir. Bu proteinler NETozis için nötrofilleri toplar ve aktive eder [125].

Nötrofiller vaskülatürde P-selektine bağlanır bunu trombosit alımı takip eder. Nötrofiller, trombositler tarafından tromboksan A2 üretimini teşvik eder. Tromboksan A2, endotel ile nötrofil etkileşimlerini güçlendirmek için intrasülüler adezyon molekül 1'in (ICAM1) endotelial hücre ekspresyonunu indükler. Bu süreç, trombosit kaynaklı yüksek mobilite grup kutusu 1 (HMGB1), ROS ve integrinleri içeren bir mekanizma aracılığıyla NETozis'i tetikler [125].

NET'ler, tromboza katkıda bulunmanın yanı sıra başka yollarla da etki ederler. Örneğin, NET'ler Faktör XIIa'yı etkinleştirir. Faktör XIIa, koagülasyonu destekleyen ve endotel hücrenin granüllerini (VWF ve P-selektin içeren Weibel-Palade cisimcikleri olarak bilinir) harekete geçiren bir proteindir [126, 127].

NET'e bağılı NE, koagölasyonu engelleyen bir faktör olan doku faktörü yolu inhibitörünü (TFPI) degrade eder ve trombosit reseptörlerini proteolitik olarak aktive ederek trombosit birikimine neden olur [128].

Alternatif mekanizmalar yoluyla salınan NET'ler, diğér koşullarda vasküler patolojiyi teşvik eder. Örneğın, NET'ler bikarbonat tuzlarının birikmesine yanıt olarak oluşur ve pankreas kanallarını tıkayarak pankreatitte neden olur [129].

Aşırı NET oluşumu influenza pnömonisinin akut akciğér hasarına katkıda bulunabilir. İnfluenzada üretilen NET'ler endotel hücrelerinin hasar görmesine neden olabilir. Enfekte alveoler epitel hücreleri ile enkübe edildiğinde, enfekte akciğérlerden gelen nötrofiller, NET oluşumunu güçlü bir şekilde indükler. Bu nedenle, NET'ler belirli enfeksiyonlara karşı kritik olsa da, hastalık patolojisinde de önemli bir rol oynadığı açıktır [130].

Şiddetli akut solunum sendromu korona virüs 2 (SARS-CoV-2), nötrofillerde ROS üretimini artırarak NETozis'i tetikler [131]. Bu virüsle enfekte olmuş epitel hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen proenflamatuvar araçılar, özellikle İL-8 ve İL-1β, dokularda ve damar içi nötrofillerde NETozis'i artırır [132, 133].

NET'ler, COVID-19 ile ilişkili immünotromboz ve organ hasarına katkıda bulunmaktadır [134]. COVID-19 hastalarında, HMGB1-DNA kompleksleri gibi NET'lerde bulunan bileşenlerin yüksek seviyelerde bulunması, dolaşımdaki NET'lerin daha yüksek seviyelerde DAMP içerebileceğini düşündürmektedir [135].

Hasta plazmasındaki NET'e özgü MPO-DNA kompleksleri, SARS-CoV-2 viral yükü ve plazma enflamatuvar belirteçleri (örneğin, C-reaktif protein (CRP) ve İL-6) ile korele olurken, bu durum COVID-19'da NET ile ilişkili bir sitokin fırtınasını ima etmektedir [136].

COVID-19 hastalarında anti-NET antikorları ve diğér otoantikorların yükseldiğı gözlemlenmiştir. Hastalarda anti-NET IgG ve IgM düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olması, kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir [137].

Anti-NET antikorları daha yüksek olan COVID-19 hastalarının pozitif otoantikorlarla tespit edilme olasılığı daha yüksektir [örneğin, antinökleer antikorlar (ANA) ve anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar (ANCA)]. Bu bulgular, COVID-19'da NET'lerin otoimmün tepkiler

için potansiyel indükleyiciler olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir [135].

NET'ler, antimikrobiyal kapasitelerinin yanı sıra, diğerk immün hücrelerini modüle ederek enflamatuvar sitokinleri doğrudan veya dolaylı olarak düzenler. Aterosklerozun erken enflamatuvar evrelerinde, mikroskobik kolesterol kristalleri NET'leri indükler, ardından NET TLR2 ve TLR4 aracılığıyla makrofajlarda İL-6 ve pro-İL-1β'yi kodlayan genlerin transkripsiyonuna yol açar. Bu sitokinlerin artarak düzenlenmesi (upregülasyon), Th-17 hücrelerinin farklılaşmasını ve aterosklerotik lezyonlara miyeloid hücre alımını artırır. NETozis için gerekli nötrofil proteazlarında eksik olan veya PAD4 inhibitörleri alan farelerde daha düşük düzeyde enflamasyon olur ve daha küçük aterosklerotik lezyonlar geliştirir [117].

Alzheimer hastalığının fare modellerinde beyinde NET'ler ve nötrofil türevli İL-17 gözlenmiştir. Bu farelerde nötrofil tükenmesinin veya nötrofil alımının bloke edilmesinin bilişsel performansı geliştirdiğı gözlenmiştir [138]. Bununla birlikte, NET'lerin nöronal dejenerasyona katkıda bulunup bulunmadığı ve nasıl katkıda bulunduğu ayrıca değerlendirilmelidir.

Schauer ve arkadaşları tarafından yürütölen bir çalışma, fare modellerinde monosodyum ürat kristalleri tarafından tetiklenen gutta NET'lerin anti-enflamatuvar bir rol oynadığını öne sürmüştür. Bu alışma, proenflamatuvar faktörlerin proteolitik nötralizasyonu tarafından yönlendirilen steril enflamatuvar hastalıkta büyük NET kümelerinin yeni bir koruyucu anti-enflamatuvar rolü olduğunu desteklemektedir. ROS eksikliği olan farelerde NET'leri serbest bırakamadıkları için daha fazla enflamasyon ve gut artriti gelişmektedir [139].

NET'ler, TRALI (transfüzyona bağı akut akciğerk hasarı) hastalarının akciğerklerinde ve plazmalarında ve TRALI'li farelerin alveollerinde de saptanmıştır. Bu hastalarda NET'ler endotel hücrelerinin hasar görmesine ve akciğerkin kapiller damarlarının sızıntısına katkıda bulunabilir [5].

2.2.5. NET'lerin otoimmünitede ve sistemik otoenflamasyondaki rolü

Sistemik otoimmün hastalıklarda, immün sistemi kendi vücut hücrelerini yabancı olarak algılar ve bu nedenle çeşitli dokulara ve organlara zarar verebilir. Bu hastalıklar, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık tepkilerinde düzensizliklerle karakterizedir ve hücre içi ve hücre dışı antijenleri hedef alan otoantikorların gelişimiyle ilişkilidir [22]. Sistemik otoenflamatuvar hastalıklar genellikle tekrarlayan ataklar ve deri lezyonları ile kendini gösterir, ancak bazıları vaskülopati ile ilişkili olabilir. Sistemik otoimmüniteden farklı olarak, otoenflamasyonda antijene özgü immün tolerans kaybı veya belirgin B veya T hücre aktivasyonu bulunmaz. Bunun yerine, otoenflamatuvar sendromlar, genellikle doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin, özellikle nötrofillerin enflamatuvar yanıtları tarafından yönlendirilir (Şekil 2.3) [140].

Uzun yıllar boyunca, sistemik otoimmün hastalıklar adaptif immün yanıtlardaki kusurlarla ilişkilendirilmiş olmasına karşın son çalışmalar, çeşitli doğal immün hücrelerin ve tip I interferon yolağının çeşitli sistemik otoimmün hastalıklarda önemli bir rol oynadığını vurgulamıştır [141, 142].

Nötrofiller insan hastalıklarında ve hayvan hastalık modellerinde genellikle doku enflamasyon bölgelerinde bulunur. Solunumsal patlama (respifactory burst) ve ROS üretimi otoimmün hastalık için önemli risk faktörleridir [143]. Birçok otoimmün koşulda, nötrofiller, sistemik lupus eritematozus (SLE) ve RA'da gösterildiği gibi NET'leri serbest bırakır. Lupus komplikasyonlarının, anti-NET otoantikorlarının titreleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir [14, 144]. NET birikiminin kanıtı ilk olarak ANCA ile ilişkili vaskülit olan hastalardan alınan böbrek biyopsi örneklerinde bildirilmiştir. ANCA ile ilişkili vaskülit olan hastalarda MPO ve proteinaz-3 gibi NET bileşenlerine karşı antikor üretildiği gösterilmiştir [11].

NET, nötrofil kaynaklı proteinlere karşı otoantikorlarla ilişkili olan otoimmün hastalıklarda, öz antijen kaynağı olabilir ve düzensiz NET oluşumu, çeşitli NET bileşenlerine karşı otoantikorlar üretilmesi yolu ile otoimmüniteyi de uyarabilir. NET'lerde bulunan çift sarmallı DNA, histonlar, sitriline olmuş peptitler, MPO ve proteinaz 3 sistemik otoimmünitede adaptif bağışıklık sistemi tarafından hedeflendiği bilinen otoantijenlerdir [145].

Hayvan modellerinde otoimmün uyarılar tarafından indüklenen NET'ler, TLR9 ve TLR7 sinyalleri yoluyla plazmasitoid dendritik hücreleri (pDC) aktive eder, tip I İFN ekspresyonunu teşvik eder ve patolojiyi yönlendirir [146].

NET'lerde buluna dsDNA, Th2 hücreleri tetikleyen DC'lerin akciğere ve mediastinal lenf düğümlerine alınmasını teşvik eder, Th2 hücre tepkilerini güçlendirir ve alerjik astımın alevlenmesine katkıda bulunur [147]. Konakçı dsDNAsı, Th2 hücre farklılaşmasını ve aktivasyonunu indüklemek için CD4+ Th hücrelerini doğrudan uyarabilir [148].

DNA oksidasyonu, tip I İFN indüksiyonunu ve otoimmüniteyi güçlendiren önemli bir modifikasyondur. Mitokondriyal ROS, NET'i oluşturan DNA'yı okside ederek interferon gen yolağının uyarıcısını (STING) aktive eder ve pDC'ler tarafından İFN üretimini tetikler [149].

Hücre dışı ortamda PAD4 aktivasyonu, bağ dokusunda bulunan fibronektin, fibrinojen, kolajen ve diğer matriks proteinlerinin sitrülasyonunu indükler. Kolajen kaynaklı artrit modelinde, PAD4'ün Cl-amidin tarafından inhibisyonu, artrit modellerinde hastalık semptomlarını iyileştirir [150]. PAD enziminin deiminaz aktivitesinin inhibitörünün, multipl sklerozun bir fare modelinde nörodejeneratif semptomları iyileştirdiği gösterilmiştir [151].

MPO ve PR3 gibi NETozis belirteçlerine karşı antinükleer antikorların, kronik otoimmün hastalarda ve hayvan modellerinde sıklıkla gözlemlendiği bilinmektedir. Ek olarak, aktif otoimmün hastalarda dolaşımdaki NET'lerin seviyeleri de artmıştır [152]. Öze ait antijenler içeren immün kompleksler NET salınımını indükler; NET bileşenleri daha sonra immün kompleks gelişimine yol açan otoantikorları indükler ve böylece bir amplifikasyon döngüsü oluşur [153]. Lupus nefritinde dolaşan immün komplekslerin glomerüler bazal membranda birikimi, bunlara ek bir patojenik rol verir [154]. Bu bulgular, NETozis'in otoimmün yanıtı tetikleyen muazzam bir otoantikor havuzu ürettiğini açıkça göstermektedir.

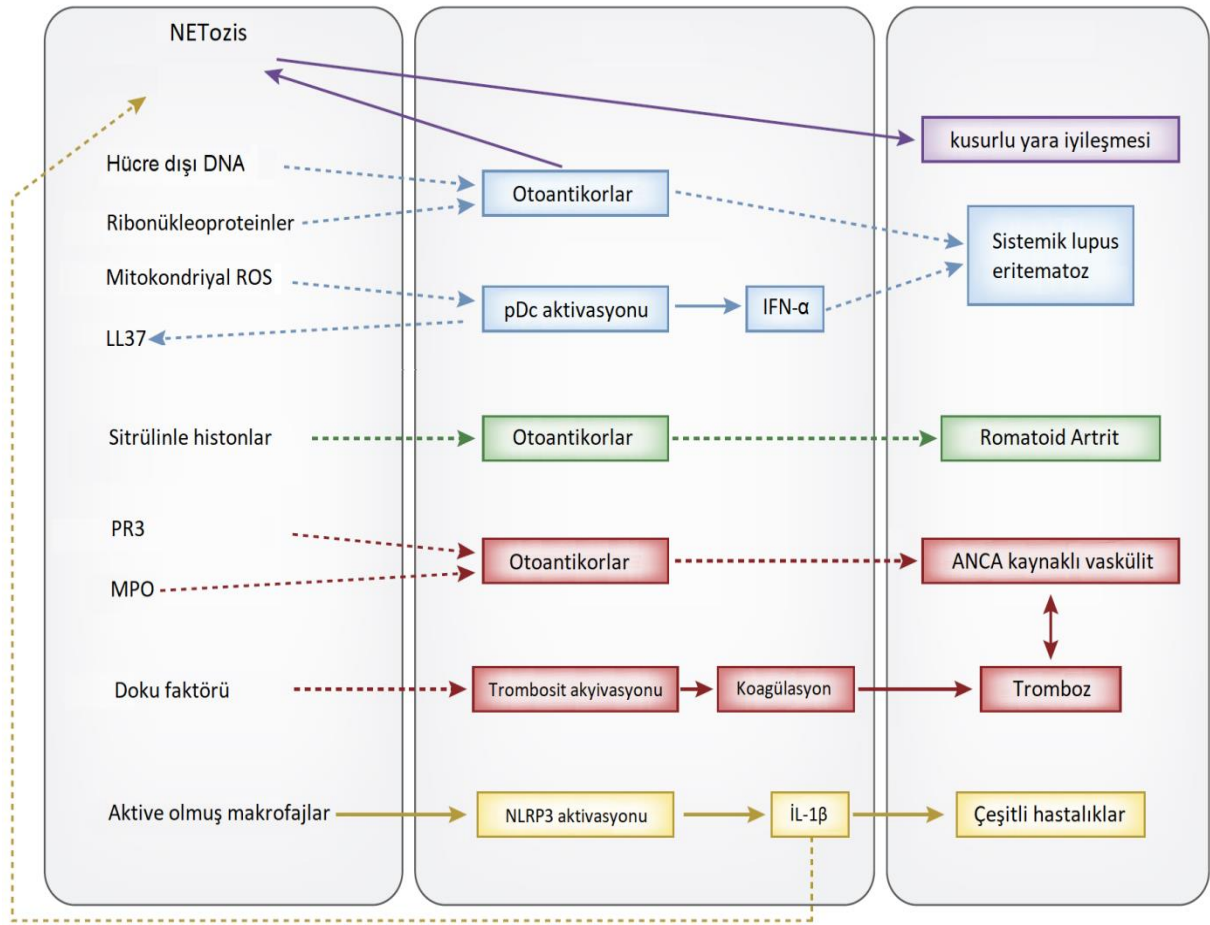
Pankreas lümenine aşırı nötrofil infiltrasyonu, epitel hücrelerinin salgı fonksiyonunu güçlü bir şekilde etkiler ve nötrofile bağımlı bir pankreatit formunu tetikler. Fare pankreatit modelinde NET'ler, pankreas dokusunda trypsinojenin aktivasyonuna doğrudan aracılık eder; bunun, akut pankreatitte önemli bir başlatıcı olay olduğu düşünülmektedir. Bu bulgu, NET'lerin DAMP formunda hareket edebilmesi veya kemokin salınımını uyarabilmesi

olasılığını artırmaktadır [155].

SLE farklı organları etkileyen multifaktöriyel sistemik otoimmün bir hastalıktır; serumda yüksek düzeyde anti-ribonükleoprotein ve anti-DNA antikorları bulunabilir, bu antikorların NETozis tarafından indüklendiği tahmin edilmektedir [156]. Ayrıca bu hastalar, sağlıklı kontrollerde bulunmayan bir düşük dansiteli granülosit (LDG) popülasyonuna sahiptir. LDG'ler, mitokondriyal ROS üretiminden sonra spontan NET üretme kapasitesinde artış göstermektedir. Bu NET'ler, sağlıklı insan nötrofillerinin NET'lerinden daha fazla patojenik otoantijen içermektedir, bu da daha fazla doku hasarına ve plazmasitoid dendritik hücrelerin aktivasyonuna yol açarak interferon salınımına neden olur [157, 13].

Sağlıklı bireylerde NET'ler enflamatuvar bölgelerde DNaz1 aracılığı ile parçalanarak temizlenir. Bu nükleazın aktivitesi önlenir veya bozulursa, NET'ler devam edebilir ve bir otoantijen kaynağı oluşturabilir. Lupuslu hastalarda DNaz1'in NET'lere erişimini engelleyen anti-NET antikorlarının varlığından dolayı NET degradasyonu bozulabilir ve bu da daha kalıcı ve uzun bir NET yarı ömrüne neden olabilir [158].

Adenozin deaminaz 2 eksikliği (DADA2) hücre dışı adenozini parçalayan ve esas olarak adenozin deaminaz 2'yi kodlayan ADA2 geninde mutasyonuna neden olan monogenik bir vaskülitir. ADA2 mutasyonu, protein aktivitesinin azalmasına yol açarak hücre dışı adenozin seviyelerinin artmasına neden olur. Bu süreç nötrofillerdeki A1 ve A3 adenozin reseptörlerinin birleşmesi yoluyla NET oluşumunu tetikleyebilir. Bu sendromdan etkilenen bireylerde NET oluşturmaya meyilli olan LDG'lerin dolaşımdaki seviyeleri de artmıştır. Bu hücrelerden üretilen NET'ler, sağlıklı kontrollerden elde edilen NET'lerle karşılaştırıldığında daha immünojeniktir ve makrofajları tetikleyerek TNF gibi enflamatuvar sitokinlerin daha yüksek düzeylerde üretilmesine yol açar. NET'lerin DADA2'li hastalarda etkilenen organlara infiltre olduğu saptanmıştır [159].



Şekil 2.3. Otoimmün hastalıklarda NET'in rolleri [96].

2.2.6. Potansiyel Anti-NET terapötik hedefler

Nötrofillerin çeşitli otoimmün hastalıklarda rol oynadığına dair önemli destekleyici kanıtlara rağmen, özellikle nötrofil düzensizliğini hedef alan az sayıda terapötik strateji bulunmaktadır. Bu durum, kısmen nötrofil sayılarını veya bunların önemli fonksiyonlarını hedeflemenin enfeksiyon duyarlılığını artırabileceği gerçeğiyle açıklanmaktadır. Örneğin, ROS genel nötrofil aktivasyonunun önemli bir bileşenidir, bu yüzden ROS üretimi kusurlu olan hastalar fırsatçı enfeksiyonlara yakalanmaya yatkındır. Bu nedenle, farmakolojik müdahaleler, diğer önemli antimikrobiyal fonksiyonları korurken, nötrofillerdeki düzensiz fonksiyonları spesifik olarak hedeflemelidir (Çizelge 2.3) [25].

Çizelge 2.3. Potansiyel Anti-NET terapötik hedefler

Hedef molekül	Farmakolojik bileşen	Etki
PAD	Cl–amidin, BB-Cl–amidin	İmmün kompleks birikimini, NETozis ve İFN azalması
Mitokondriyal ROS	MitoTEMPO	NETozis ve İFN azalması
Kalsinörin	Siklosporin A, Askomisin	NETozis azalması
MPO	PF1355 - MPO antikor	Plazma MPO aktivitesinin azalması
DNA	DNaz1, DNaz1L3	NET'lerin degradasyonu
EP2 ve EP4 reseptörler	PGE2	NETozis'in cAMP-PKA yolu inhibisyonu
NF-κB	Asetilsalisilik asit BAY11-7082	NETozis azalması
Histon	Heparin	Histonların etkisizleştirilmesi

NETozis'i bloke etmenin bir yolu olarak NADPH oksidazın bozulması, bu mekanizmaların ciddi enfeksiyonlar da dahil olmak üzere kronik granülomatöz hastalık benzeri

komplikasyonlara neden olabilir. Son zamanlarda, ROS üretimini engellemeyen potansiyel bir endojen NET inhibitörü tanımlandı. Lökosit sinyal inhibitör reseptörü (SIRL)-1 NET'lerin nötrofillerden salınmasını baskılar, oysa fagositoz, oksidatif patlama ve *S. aureus*'un öldürülmesi etkilenmez [160]. Bu reseptörü uyarabilecek monoklonal antikörlerin üretilmesi, yeni immünoşüpresif ilaçların geliştirilmesi için umut verici olabilir.

NETozis'i inhibisyonu için gelecek vadeden bir başka hedef, oksidatif patlamayı etkilemeden NETozis'i bloke eden PAD4'ün inhibisyonudur. PAD4 enzim inhibitörleri, örneğin N-alfa-benzoil-N5-(2-kloro-1-iminoethyl)-L-ornitin amid ve bu enzimlerin genetik ablasyonu, deneysel modellerde hastalık belirtilerini başarılı bir şekilde azaltmış ve *in vitro* olarak NET formasyonunu inhibe etmiştir. Diğer PAD inhibitörleri (örneğin Cl-amidin veya BB-Cl-amidin) lupus, artrit ve diyabetik fare modellerinde hastalığı geciktirmiştir [150, 161].

Bir fare lupus modelinde, PAD4 inhibitörü (BB-Cl-amidin) ile yapılan tedavinin, fareleri NET aracılı damar hasarı, endotel disfonksiyonu ve böbrek hasarı gelişmesinden koruduğunu göstermiştir. PAD4 inhibisyonu, IFN-1 regülatör genlerin ekspresyonunu ve böbrekte immün kompleks birikimini önemli ölçüde azaltır ve cilt hastalıklarına karşı koruma sağlar [162]. Bu ilaçların insanların genel bağışıklık düzeylerini nasıl etkileyebileceği henüz belirlenmemiştir; ancak farelerdeki ön kanıtlar, NET oluşumunun azalarak düzenlenmesinin, nötrofillerin antimikrobiyal fonksiyonunu önemli ölçüde engellemediğini göstermektedir [108]. Siklosporin A ve takrolimus gibi kalsinörin inhibitörleri SLE'de PAD aktivitesini azaltarak çok başarılı etkiler göstermiştir [163, 164].

NET'leri hedeflemeye yönelik başka bir strateji de DNaz'ın kullanılmasıdır. Klinik olarak kullanılan DNaz, NET üretimini engellemez, NET yapısını bozar. DNaz1'in uygulanmasının, meme kanseri fare modellerinde NET'lerin bozulmasına ve hastalık şiddetinin azalmasına neden olduğu ancak rekombinant DNaz ile tedavi edilen lupus hastalarında hastalıkta herhangi bir değişiklik yapmadığını ortaya çıkarmıştır [165-167]. DNA'yı DNaz1'e göre daha etkili bir şekilde parçalayan DNaz1L3 gibi diğer nükleazlar kullanılarak, insanlarda potansiyel bir terapötik seçenek olup olamayacağı daha fazla araştırılabilir [168].

Mitokondriyal ROS üretimi için spesifik bir temizleyicinin (MitoTEMPO) *in vivo* olarak uygulanmasının, hastalık şiddetini, tip IFN-1 yanıtlarını ve lupus fare modelinde kemik iliği nötrofilleri tarafından spontan NETozis'i azalttığı gösterilmiştir [169]. İdebenon ve mitoQ adlı ilaçlar, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu hedef alarak NET oluşumunu azaltmış ve lupusa yatkın farelerde klinik semptomları azaltmayı başarmıştır [170].

NE ve MPO gibi patojenik NET ürünlerinin hedeflenmesi, fare modellerinde etkinlik göstermiştir ancak henüz otoimmün hastalıklarda insan denemelerinde test edilmemiştir. PF1355 adı verilen bir MPO inhibitörü de fare modellerinde vaskülit azaltmıştır [171].

İlginç bir şekilde, hematopoietik kök hücre naklinden sonra yüksek oranda eksprese edilen prostaglandin E2 (PGE2), NETozis'in endojen bir fizyolojik inhibitörü olarak tanımlanmıştır. PGE2'nin uygulanması, *in vitro* olarak ve bir fare modelinde NETozis'in azalmasıyla sonuçlanmıştır [172].

Halihazırda bir dizi hastalık için kullanımda olan çeşitli hastalık modifiye edici ilaçlar, nötrofil fonksiyonunu doğrudan veya dolaylı olarak değiştirebilirler. Bunlar arasında TNF, IL-17 ve G-CSF gibi sitokinler ve C5a gibi diğer proenflamatuvar molekülleri nötralize eden antikorlar bulunur. Spesifik veya daha geniş nötrofil fonksiyonlarını hedef alabilen diğer ilaçlar arasında CXCR2 inhibitörleri, Janus kinaz (JAK) inhibitörleri, siklosporin A ve aspirin gibi steroid olmayan antienflamatuvar ilaçlar (NSAID) ile hidroklorokin gibi antimalaryaller yer alır [173-176].

Siklosporin A'nın etki mekanizması, sitofiline bağlanmayı içerir, bu da T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) aktive edilmiş transkripsiyon faktörünün aşağı regülasyonu ile sonuçlanır ve kalsinörin yolunun inhibe edilmesini takiben NET oluşumunu inhibe eder. Siklosporin A, askomisin ve rapamisin'in kalsiyum havuzları üzerindeki rolünü ve bunların NETozis modülasyonunu analiz eden çalışmalar, askomisin ve siklosporin A kombinasyonunun NETozis'i azalttığını ancak aynı etkinin rapamisin tedavisinden sonra belirgin olmadığını göstermektedir [177]. Siklosporin A normal konakçı immün tepkilerini bozabilir ve hastaları sık enfeksiyonlara yatkın hale getirebilir. Bu nedenle, bu ilaçların NETozis'i güvenli bir şekilde yönetmek için nasıl formüle edilebileceği konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Asetilsalisilik asit (Aspirin), antitrombotik ve antienflamatuvar etkiye sahip, enflamatuvar semptomların tedavisinde kullanılan, steroid olmayan bir ilaçtır. Siklooksijenaz enziminin asetilasyonu yoluyla işlev görür. Tromboksan A₂'yi inhibe ettiğinden arteriyel trombozun önlenmesi için antitrombotik ajan olarak kullanılır. Son kanıtlar, trombositlerin patojenlerle etkileşime girerek veya PAMP'leri tanıyarak doğal bağışıklıkta doğrudan bir rol oynadığını ve trombosit-nötrofil etkileşimi yoluyla NETozis'i aktive ediklerini göstermektedir. TLR2 ve TLR4 yoluyla trombosit aktivasyonu NETozis'i indükleyen P-selektin ekspresyonuna yol açar. Trombositler, NET'ler oluşturmak üzere trombin ve araşidonik asit tarafından da aktive edilebilir. Endotoksinle tetiklenen akut akciğer hasarı üzerine yapılan bir çalışmada, farelerin aspirinle tedavisinin, intravasküler NET oluşumunun ve akciğer hasarının derecesinin azalttığını göstermiştir. NET'lerin farelerde transplantasyon üzerindeki etkileri üzerine yapılan başka bir çalışmada, aspirinin trombosit aktivasyonunu inhibe ettiği keşfedilmiştir. Aspirin, NETozis'i teşvik eden enflamatuvar bir transkripsiyonel düzenleyici olan NF- κ B'yi inhibe ederek işlev görür. Bu sonuçlar, aspirinin trombositlerin neden olduğu patolojik NETozis tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir [178].

2.3. Romatoid Artrit

En sık görülen enflamatuvar artrit türü olan romatoid artrit, tipik olarak eklemlerde, tendonlarda ve ligamentlerde deformiteye, kıkırdak ve kemiklerde erozyona yol açabilen, sistemik bir otoimmün hastalıktır. Enflamasyon sürecinde, kardiyovasküler hastalık, osteoporoz ve lenfoproliferatif hastalıklar gibi diğer sağlık sorunlarının riskini artırabilir. RA, simetrik poliartriküler bir kronik enflamatuvar hastalıktır, ancak bazı hastalarda aralıklı eklem tutulumu da görülebilir [179].

Erken teşhis konulamaz ve uygun antiromatizmal tedavi başlanmazsa, hastalarda eklem hasarı ve deformitesi artabilir ve geri dönüşü olmayan sakatlıklar ortaya çıkabilir. Aslında, otoantikorlar RA'nın önemli bir özelliği olsa da (seropozitif RA), bazı bireylerde bu otoantikorlar negatif olabilir (seronegatif RA) ve hastalığın eklem belirtilerini diğer enflamatuvar poliartrit tiplerinden ayırt etmek zor olabilir [180].

2.3.1. Romatoid artrit epidemiyolojisi ve etiyolojisi

RA her yaşta ortaya çıkabilir ancak görülme sıklığının yaşla birlikte arttığı bulunmuştur; 18 ila 34 yaşları arasında her 100 000 kişide 8,7, 85 yaş ve üzerinde her 100 000 kişide 54 kişide görülür. RA insidans ve prevalansı kadınlarda erkeklere göre 2-3 kat daha yüksek seyreder; yapılan bir çalışmaya göre gelişme riski kadınlarda %3,6 ve erkeklerde %1,7 olarak saptanmıştır. RA multifaktöriyel mekanizmalarla oluşan bir hastalıktır. Hastalık için ana risk faktörleri arasında genetik yatkınlık, cinsiyet ve yaş, obezite, sigara kullanımı, enfeksiyöz ajanlar, periodontal hastalık, bağırsak mikrobiyomu, hormonal etkenler, diyet, sosyoekonomik ve etnik faktörler yer almaktadır [181, 182].

RA’da genetiğin etkisinin %40 olduğu tahmin edilmiş ve beyaz popülasyonda, RA riski için 100’den fazla genetik lokus bulunmuştur [183]. RA ile İnsan Lökosit Antijeni (HLA)-DR4’ün alt aleli HLA-DRB1 lokusu ve alelleri arasında kuvvetli bağlantı görülmüştür. PTPN22 geni, lenfoid spesifik fosfataz adı verilen bir proteini kodlar, RA ile ilişkili 1858. pozisyonunda tek bir nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır [183, 184].

Sigara içmek, sitriline proteinlerine karşı anti-siklik sitrulinat (anti-CCP) antikorlarının üretimini artırır ve T hücreleri tarafından salınan TNF- α aktivitesinde artışa neden olabilir. Sigara içmek RA’da etkili olduğu gösterilen en önemli çevresel faktördür [185].

Çalışmalarda obezitenin RA için bir risk faktörü olduğu bulunmuştur. Bir meta-analizde, normal vücut ağırlığına sahip bireylere kıyasla, obez kişilerde %30, aşırı kilolu olanlarda ise %15 daha fazla risk olduğu gözlenmiştir [186].

Viral enfeksiyonların RA’nın tetikleyicisi olabileceğine dair teoriler mevcuttur. Bir çalışmada Epstein-Barr (EBV) virüsüne ait deamine olmuş proteinin anti-sitriline protein antikorlar (ACPA) ile reaksiyona girdiği görülmüş ve RA’ya özgü bu antikorları stimüle ettiği gözlenmiştir [187].

2.3.2. Romatoid artritinin klinik belirtileri ve sınıflandırma kriterleri

RA semptomları, hastaların günlük yaşam aktivitelerini etkileyebilir; örneğin yürüme, giyinme, sandalyeden kalkma gibi aktiviteler zorlaşabilir. Eklem enflamasyonu meydana gelmeden önce, poliartrit, miyalji, kilo kaybı, depresyon, yorgunluk gibi sistemik semptomlar özellikle 60 yaşından sonra başlayan hastalarda görülebilir. Klasik RA erken dönemleri genellikle sinsi başlangıçlı olup, baskın semptomlar sıklıkla metakarpofalangeal, proksimal interfalangeal ve metatarsfalangeal eklemlerde, el ve ayak bileklerinde ağrı, sabah tutukluğu ve şişme şeklinde olabilir (Resim 2.1) [188].

Eklem deformiteleri, hareket sınırlandırılması, kavrama gücünde kayıp gibi bulgular RA'nın geç dönem belirtileri arasında sayılabilir. El bileğinin sinoviti, karpal tünel sendromu şeklinde gelişebilir ve median sinirin karpal tünelden geçerken sıkışması parmakların duyu kaybına neden olur. Tendonun fleksiyon pozisyonunda tuzaklanması ile tendonun kalınlaşması veya tendon kılıfında nodüller oluşabilir, gelişen nodüller tendon ruptürüne sebep olabilir. RA'lı hastaların yaklaşık %80'inin kanında RF ve/veya ACPA antikorları bulunur. Bu nedenle ellerde küçük eklem tutulumu, sabah katılığı öyküsü ve RF veya ACPA pozitifliği olan bir kişinin RA olma olasılığı yüksektir [188].



Resim 2.1. Romatoid artritinin klinik belirtileri [189]

2010 yılında ACR ve Avrupa Romatoloji Birliği (EULAR) tarafından yeni RA sınıflama kriterleri yayımlanmıştır (Çizelge 2.4). 2010 ACR/EULAR kriterleri, hastalık sürecinin erken aşamalarında tanı koymayı ve uygun tedaviyi başlatmayı kolaylaştırmayı hedefler. Ayrıca, araştırmacılar için homojen hasta grupları oluşturarak klinik çalışmalarda tutarlı sonuçlar elde etmeyi sağlar. Bu sınıflandırma enflamatuvar sinovit ile başvuran hastalarda, akut faz yanıtı, otoantikor pozitifliği, eklem tutulumu ve semptom süresine dayalı bir algoritma şeklindedir. Örneğin, el ve bilek eklemlerinde 6 haftadan fazla süren semptomlar, romatoid faktör ve anti-CCP gibi kriterler dikkate alınır. Bir eklemden aktif sinoviti olan ve 10 üzerinden en az 6 puan alan hastalarda kesin RA tanısı konulmuş olur [190].

Çizelge 2.4. ACR ve Avrupa Romatoloji Birliği (EULAR) tarafından RA sınıflandırma kriterleri

Eklem Tutulumu		Seroloji		Akut Faz		Semptom Süresi	
1 Büyük eklem	0	Negatif RF ve negatif anti-CCP	0	Normal CRP ve ESR	0	6 haftadan kısa	0
2-10 Büyük eklem	1	Düşük pozitif RF veya düşük pozitif anti-CCP	1	Yüksek CRP veya ESR	1	6 haftadan uzun	1
1-3 Küçük eklem	2	Yüksek pozitif RF veya yüksek pozitif anti-CCP (Üst limitin 3 katı)	2				
4-10 Küçük eklem	3						
>10 eklem	5						

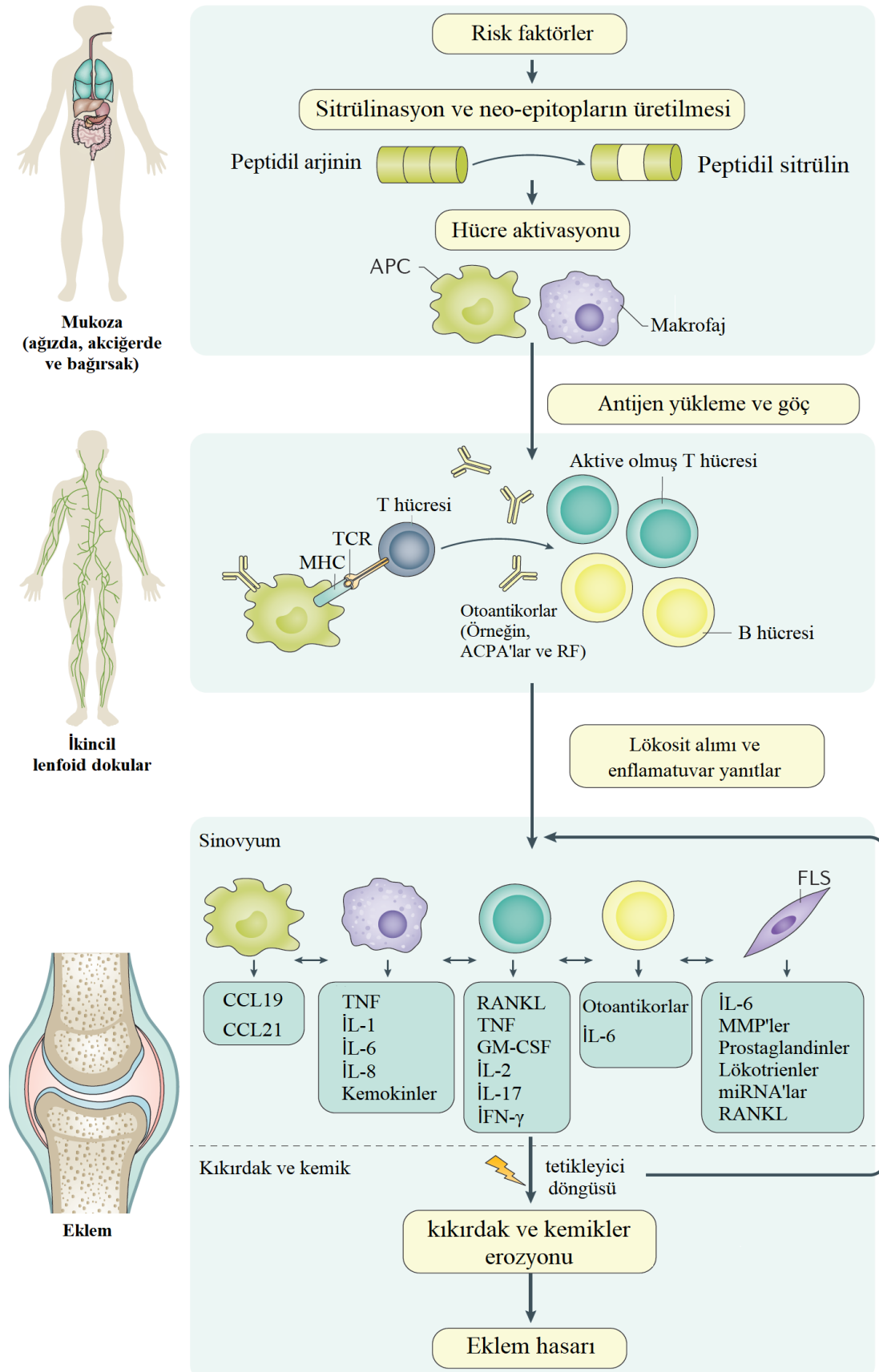
2.3.3. Romatoid artritin immünopatolojisi

Risk faktörleri mukozal bölgelerdeki hücreler üzerinde etkili olabilir ve sitrülasyon (deiminasyon olarak da bilinir) olarak adlandırılan süreçte hücre içi proteinler (histonlar gibi) ve matriks proteinlerinde (örneğin fibronektin ve vimentin) argininin sitriline dönüşümünü teşvik edebilir. Sitrülasyon, birkaç organın homeostazını koruyan, ancak enflamasyon sırasında aniden çoğalan bir fizyolojik süreçtir. RA'da hastalığın hedef organlarında, özellikle sinoviyumda ve miyokard dokusunda çoklu proteinler sitriline edilir.

Sitrülinasyon spondiloartrit hastalarının sinoviyumunda ve diğer enflamatuvar bozukluklarda patofizyolojik bir rol oynar. Sitrülinasyon, PAD enzimleri tarafından gerçekleşir. PAD'ler, hücre dışı kalsiyum akışına neden olan apoptoz veya hücre içi kalsiyum mobilizasyonuna yol açan LPS gibi farklı uyaranların bir sonucu olarak inaktif formdan, aktif forma dönüşebilir. Bu aktivasyon süreci, sitrülinasyonun gerçekleşmesine ve proteinlerde argininin sitrüline dönüşümüne yol açar. PAD4 eksikliği olan farelerde artrit şiddeti ve otoantikör titreleri azalır [191-194].

Sitrülinasyon veya diğer translasyon sonrası modifikasyonları (örneğin asetilasyon veya karbamilasyon) takiben, değiştirilmiş peptitler majör doku uygunluk kompleksi (MHC) proteinlerine bağlanır. MHC'ler foliküler T hücreleri aktive eder. T hücreler İL-21 gibi sitokinler üreterek B hücrelerin RF (IgG'leri hedefleyen) ve ACPA'ları (sitrülinlenmiş proteinleri hedefleyen) içeren, öz proteinlerini tanıyan antikörler üretmesi ve afinite matürasyonu için uyarır [195]. ACPA'ların varlığı tek başına sinovite neden olmak için yeterli değildir. Sinovit, artmış vasküler geçirgenlik ve enflamatuvar hücrelerin sinoviyuma infiltre olması ile karakterizedir. Bu durum, immün kompleks oluşumu, kompleman aktivasyonu gibi süreçleri içerebilir. Bu nedenle, sinovit gelişimi genellikle birden fazla immünolojik ve hücrel etkenin bir araya gelmesiyle tetiklenir [196].

Erken sinoviyal enflamasyon, stromal hücre aktivasyonu ile birlikte mononükleer hücre ve makrofaj infiltrasyonu ile karakterize edilir. Semptomların başlangıcından sonraki 1 haftada alınan sinoviyal biyopsi numuneleri, matriks degradasyonunu etkileyen enzimlerin (örneğin matriks metaloproteinazlar - MMP'ler) yüksek düzeyde ekspresyonunu gösterir. RF ve ACPA otoantikörlerine ek olarak tip 2 kolajen (özellikle okside olmuş formda), glikoz-6-fosfat izomeraz, proteoglikanlar, nükleer antijenler ve diğer eklem otoantijenleri gibi faktörler, otoantikörlerin olası patogeneze katkıda bulunacağı yolları genişletir (Şekil 2.4) [197].



Şekil 2.4. Romatoid artritinin başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynayan mekanizmalar [189]

Her iki sinoviyosit tipinin artışı ve aktivasyonu, sitokinlerin ve proteazların yüksek miktarda ekspresyonuna neden olur. Makrofaj benzeri sinoviyositler, İL-1, İL-6, TNF gibi çeşitli proenflamatuvar sitokinler üretir. Fibroblast benzeri sinoviyositler (FLS) ise, İL-6'ya ek olarak MMP'ler, prostaglandinler ve lökotrienler gibi mediatörleri büyük miktarlarda üretebilirler. Bu sinoviyositlerin aktivasyonu, enflamatuvar yanıtın devamını sağlayan ve eklem hasarına yol açabilen bir dizi moleküler olayı tetikler [198].

Sinoviyal sıvıda birçoğu RF veya ACPA üreten B hücreleri, plazmoblastlar ve plazma hücreleri de mevcuttur. CD4+ T hücreleri dokuya infiltre olabilir ve hastaların %15-20'sinde olgun B hücrelerinin çoğaldığı, farklılaştığı ve antikör ürettiği ektopik germinal merkezlerde bulunur. Bu ektopik germinal merkezler, otoantikör üretiminin artmasına ve hastalığın progresyonuna katkıda bulunabilir [199, 200].

Antijen sunan foliküler dendritik hücreler, makrofajlar, nötrofiller ve mast hücreleri de sinoviyal sıvıya akın eder ve sitokinler, NET'ler ve MMP'lerin salınması yoluyla eklem hasarına katkıda bulunur. Endojen MMP inhibitörleri de eksprese edilir ancak kemik yıkımını bloke etmede yetersiz kalırlar [201, 202].

Kemik erozyonları büyük ölçüde osteoklastların olgunlaşması ve aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Osteoklastların gelişimi, iki temel osteoklastojenik mediyatör olan makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF)-1 ve RANKL'in ekspresyonu sonucunda sinoviyal dokuda lokal olarak meydana gelir. RA sinoviyal dokusunda eksprese edilen TNF, prekürsör hücrelerde ekleme girmeden önce osteoklastla ilişkili reseptörün (OSCAR) ekspresyonunu uyarır. M-CSF-1, RANKL ve OSCAR reseptörlerinden gelen sinyaller monositlerin osteoklastlara farklılaşmasını sağlar. Osteoklastların aktivasyonu için gerekli olan TNF sinoviyumda makrofajlar ve FLS tarafından üretilirken, RANKL T hücreleri tarafından eksprese edilir. Osteoklastlar, benzersiz asidik lokal doku mikro ortamında katepsin K dahil proteazlar üreterek mineralize kemik matriksini bozabilirler [202, 203].

Ayrıca ACPA'ların, osteoklastlar ve osteoklast öncülleri tarafından ifade edilen sitrülینlenmiş peptitlerle (örneğin sitrülینlenmiş vimentin) etkileşime girdiği ve bu etkileşimin osteoklast olgunlaşmasına ve aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, ACPA'ların potansiyel olarak eklem hasarının başlatılmasından sorumlu olabileceği düşünülmektedir [204].

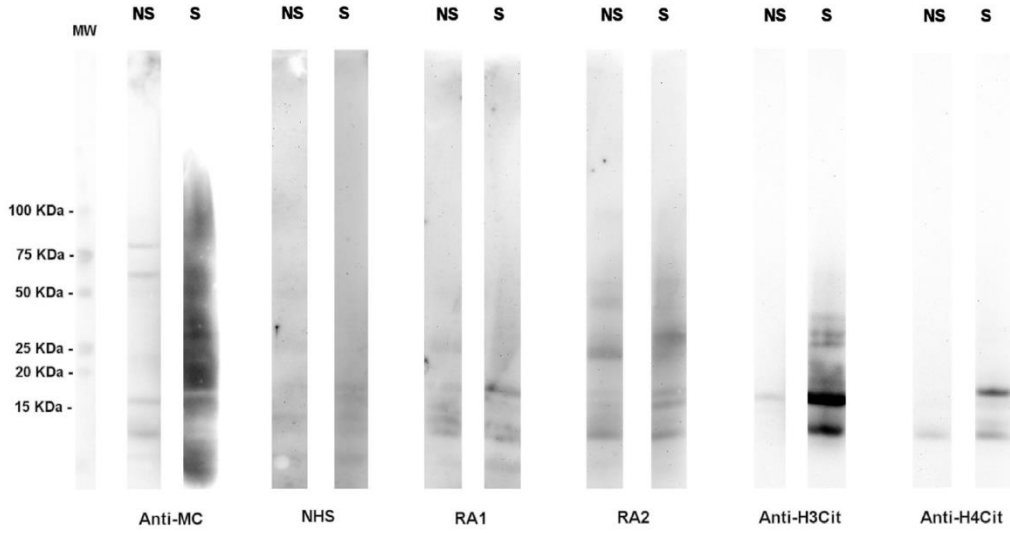
İL-1 reseptör antagonist proteini (İL-1RA), solüble TNF reseptörleri, İL-10 ve İL-35 makrofajlar, nötrofiller ve fibroblastlar tarafından lokal olarak üretilir ancak enflamatuvar yanıtı hafifletmek için yetersizdir [205].

İL-6 ve TNF'yi hedef alan terapötik ajanlar klinik çalışmalarda başarılı olmuştur. Buna karşılık İL-1 ve İL-17 inhibitörleri daha az başarılı olmuş; İL-6 ailesi üyeleri, interferonlar ve İL-15 ve İL-7 gibi ortak sinyal iletilici γ -zincir kullanan sitokinler de dahil olmak üzere pek çok sitokin, yüzey reseptörlerine bağlandıktan sonra JAK'lar yoluyla sinyal verir. JAK inhibitörleri, özellikle JAK1 inhibitörleri, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu önler ve RA'ya yönelik etkin terapötiklerdir [206].

2.3.4. Romatoid artrit patogeneğinde NETozis'in rolü

RA sinoviyal sıvısında özellikle erken hastalık evrelerinde artan nötrofiller, bu hücrelerin eklem hasarında, eklemden enflamatuvar süreçlerinin başlatılması ve sürdürülmesinde belirgin bir rol oynadığı düşüncesini destekler [207].

NET'ler sitrülünlenmiş otoantijenlerin kaynağıdır; MPO, NE ve katepsin G gibi nötrofil granüler proteinler, muhtemelen aşırı NETozis nedeniyle sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunur ve eklem hasarına katkıda bulunabilirler (Şekil 2.5). RA otoantikorları (anti-sitrülünlenmiş vimentin (CV) ve RF dahil), diğer otoantikorlar için bildirilenlere benzer şekilde (küçük damar vaskülit için ANCA ve SLE için anti-ribonükleoprotein) NETozis'i güçlü bir şekilde indükler. NETozis, RA periferik kanında ve sinoviyal sıvı nötrofillerinde artar ve RA'lı hastalardan alınan periferik kan ve sinoviyal sıvı nötrofilleri, osteoartritli hastalardan izole edilen nötrofillerle karşılaştırıldığında NET oluşturma konusunda önemli ölçüde yüksek bir eğilim gösterir. Ayrıca, LPS uyarımı üzerine hastaların periferik kan ve sinoviyal sıvı nötrofilleri, kontrol ve osteoartritli hastaların nötrofilleriyle karşılaştırıldığında NETozis konusunda önemli ölçüde gelişmiş kapasite sergiler. Nötrofilik dermatozlardan etkilenen RA'lı hastaların sinoviyal dokularında, romatoid nodüllerinde ve ciltlerinde NET'ler tespit edilmiştir [14, 208].



Şekil 2.5. Uyarılmış nötrofillerde üretilen bir dizi sitrülünlenmiş protein [208]

Sitrülünlenmiş vimentine karşı gelişen otoantikorlar RA'lı hastalarda osteoklastogenezi ve kemik erozyonunu indükler. Vimentini tanıyan anti-CV antikorları, kontrol ve RA nötrofillerinde IgG ile karşılaştırıldığında NETozis'i daha güçlü bir şekilde indükler. NETozis sitrülünlenmiş otoantijenlerin nötrofillerden salınmasına neden olur ve NET'lerde bulunan sitrülünlenmiş proteinlere karşı üretilen otoantikor NETozis'i tetikleyerek enflamatuvar süreçlerinin sürdürülmesinde rol alır. CV, FLS'de proenflamatuvar sitokinler, PAD4 ve RANKL ekspresyonunu indükler [14,204]. Sinoviyal sıvıda, nötrofiller NETozis sırasında enzimatik olarak aktif PAD2 ve PAD4'ü salgılar ve hücre dışı proteinleri de sitrülüne edebilir (Şekil 2.6) [209].

Kontrollere kıyasla RA'lı hastaların daha yüksek deamine olmuş histon H3 seviyeleri, dolaşımdaki nötrofillerde daha yüksek spontan NETozis olduğunu düşündürmektedir [210]. RA'lı hastalarda sitrülüne edilmiş H2A ve H2B sekanslarına karşı antikorlar tespit edilmiştir. RA sinoviyal sıvıları, proenflamatuvar ve immün sistemi uyarıcı kapasiteye sahip olan yüksek düzeyde sitrülünlenmiş H2B ve onun immün kompleksini içerir [211].

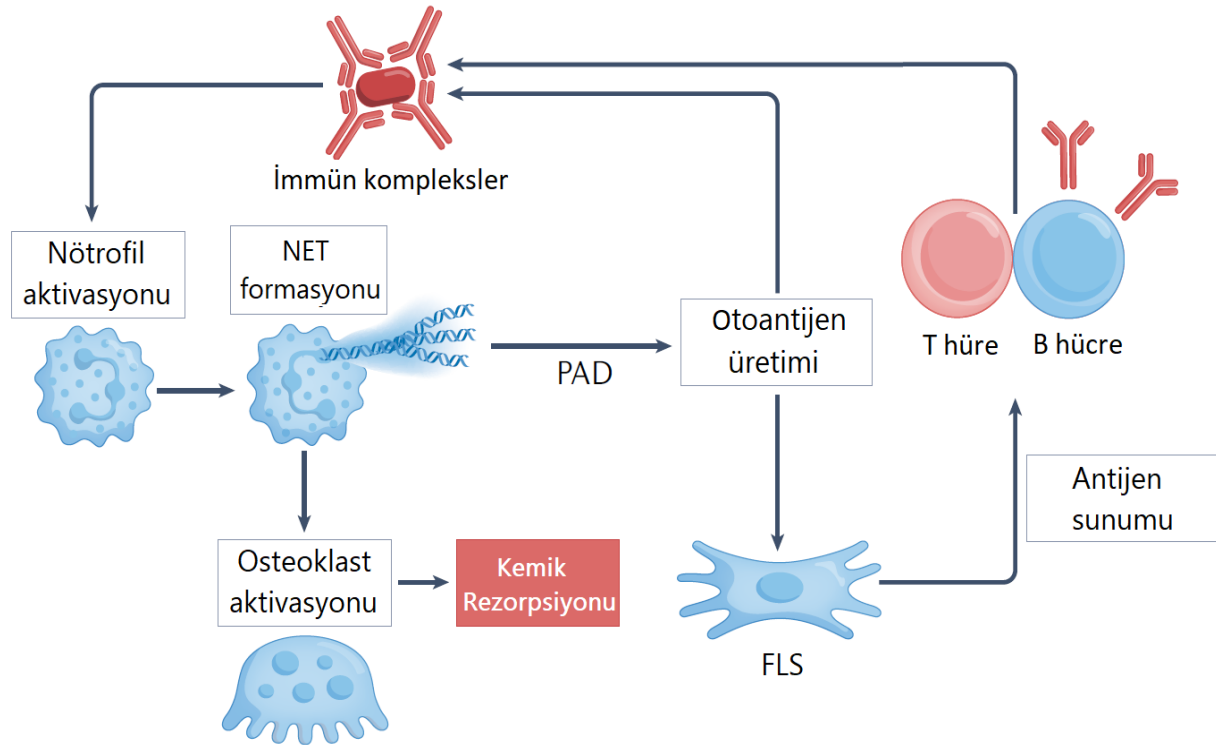
Histonlar, ROS ve MPO tarafından karbamile de edilebilir, bu süreç bu modifiye edilmiş peptitlere karşı otoantikorların üretimini destekleyebilir. Karbamilleştirilmiş proteinlere karşı antikorlar romatoid artritli hastalarda yaygındır ve artmış kemik erozyonu ile ilişkilidir [212].

NET'lerde bulunan NE, kıkırdak yapısını bozabilir ve sitrülünasyonunu destekleyebilir. Bu

süreç otoantikor üretimini artırarak sinoviyal enflamasyona yol açabilir [213].

NETozis sonucunda salınan LL-37 veya HMGB1 gibi tehlike sinyalleri profesyonel antijen sunan hücrelerin aktivasyonunu ve olgunlaşmasını teşvik eder. Aktive olan antijen sunucu hücreler (APC) NET'leri alır, daha fazla işler ve T hücelere sunarak bu hücrelerinin tetiklenmesini kolaylaştırır. Ayrıca B hücrelerinin afinite maturasyonunu ve klonal gelişimini destekleyerek ACPA üretimine yol açabilir [214]. Sitrülinlenmiş proteinler (histon H3, histon H4 ve vimentin gibi) içeren NET'ler, FLS tarafından TLR9'a bağımlı bir şekilde alınır ve bu hücrelerde MHC sınıf II ekspresyonunun artırarak NET peptidlerinin CD4+ T hücrelerine sunulmasına yol açar [215]. NET veya LL-37 ve histonlar gibi NET bileşenlerine maruz kalma makrofajlarda aktif kaspaz-1 üretilmesine neden olur, bu da aktif İL-1 β ve İL-18'in üretilmesine yol açar, pDC ise NET bileşenleriyle aktive edildiğinde İFN- α eksprese eder [216, 217].

Dolayısıyla NET, hem bir otoantijen kaynağını temsil eder hem de çeşitli hücre tiplerini etkileyerek de enflamasyonda rol alır.



Şekil 2.6. Romatoid artrit patogenezinde NETozis'in rolü [25]

2.4. Psöriatik Artrit

PsA eklem hasarı ve deri bulgularıyla seyreden, psöriazis ile ilişkili, heterojen klinik özelliklere sahip enflamatuvar bir hastalıktır. Vakaların çoğunda, plakların gelişimi artrit başlangıcından yıllar önce gerçekleşir, ancak hastaların az bir kısmında psöriazis gelişmeden önce eklem tutulumu başlayabilir. Bu nedenle derideki patolojik enflamatuvar süreçlerin eklem hastalığının gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Eklem ve cilt belirtilerinin yanı sıra, birçok hastada metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalık, diyabet, hiperlipidemi, karaciğer hastalıkları gibi komorbiditeler de mevcuttur [218].

PsA için özel bir tanı kriteri veya testi yoktur. Genellikle, tanı, RF ve antisiklik sitrülünlenmiş peptidin (CCP) negatif olduğu, ancak deri ve/veya tırnak erozyonu ile birlikte eklemlerde, kas kırıları (tendon) ve bağların kemiklere yapışma yerleri olan entezlerde (entezis) veya omurgada enflamatuvar özelliklerin tespit edilmesiyle konulur [219].

2.4.1. Psöriatik artrit epidemiyolojisi ve etiyolojisi

Genel popülasyonda artrit prevalansı % 2-3 iken, psöriatik hastalarda bu oran % 7-41 arasında değişir. Psöriazis prevalansı ise genel popülasyonda % 0,1-3 arasında iken, artritli hastalarda bu oran % 2,5-7,0 arasında değişir. Hastaların %75'inde deri lezyonları artrit önceden görülürken, %15'inde bu iki semptom eş zamanlı olarak görülmektedir [220]. PsA'nın prevalansı 30-60 yaş arası hastalarda en yüksektir; erkek ve kadınları eşit derecede etkiler [221]. PsA beyaz ırkta siyah ırka göre daha sık görülür. Bu artan insidansın spesifik olmayan bir genetik temele mi dayandığı yoksa kısmen koyu ten rengine sahip hastalarda psöriazisin teşhisindeki zorlukla mı ilişkili olduğu açık değildir [222].

Hastalığın etiyolojisinde HLA bölgesinde genetik duyarlılık, interferon ve NF-κB sinyalizasyonunda rol oynayan genlerdeki varyantlar, çevresel faktörler, mikrobiyom, obezite ve hiperlipidemi gibi eşlik eden hastalıkların yanı sıra, sedef hastalığının şiddeti de rol almaktadır [224-226]. PsA'lı hastalarda % 50-60 oranında pozitif saptanan HLA-B27'nin entezit, daktilit, simetrik sakroiliit ve spondilit ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir [223]. PsA duyarlılığı ile ilişkili olduğu bildirilen genetik risk lokuslarının çoğu, İL-17 sinyalizasyonda yer alan İL-12B ve TRAF3IP2 gibi psöriazis ile paylaşılmaktadır [227].

Travmaya, özellikle kemik ve eklem travmasına maruz kalan psöriazis hastalarında, kontrollerle karşılaştırıldığında PsA riskinin arttığı gösterilmiştir [228]. Ayrıca, enfeksiyonun PsA'yı tetiklemeye bir rol oynadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, T hücrelerini hedef alan ancak CD8+ T hücrelerini hedef almayan HIV enfeksiyonu olan bireylerde PsA'nın genel popülasyona göre daha yaygın ve ağır şekilde ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, travma ve enfeksiyon gibi çevresel faktörlerin PsA gelişiminde potansiyel bir rol oynayabileceğini ve hastalığın heterojen doğasını vurgulamaktadır [229].

2.4.2. Psöriatik artrit klinik belirtileri ve sınıflandırma kriterleri

PsA'da, eklemde ağrı, şişlik, ısı artışı, hassasiyet ve genellikle asimetrik 30 dakikadan fazla süren sabah tutukluğu görülmektedir (Resim 2.2). Bu hastalar ilerlemiş eklem deformitesi ile başvurabilirler çünkü PsA'lı hastalarda diğer enflamatuvar artritlere göre daha az ağrı görülebilir. En sık görülen tip asimetrik oligoartrit ve simetrik poliartriküler artrit şeklinde olur. Hastaların %40-50'sinde distal interfalangeal eklem ve omurga tutulumu, %30'unda ise daktilit bulunur. Entezit, hastaların %20-40'ında, en sık aşil tendonunda ve plantar fasyada görülürken, %4 vakada ilk görülen klinik durumdur. PsA'lı hastaların %75'inde artritlen önce deri lezyonları görülmektedir. Tırnak tutulumu genellikle eklem tutulumundan genellikle 1-2 yıl önce başlar ve tırnak renk değişikliği, çukurlar (pitting), transvers (yatay) çizgilenme, subungal hiperkeratoz, splinter hemorajiler ve tırnağın total yıkımı gibi belirtilerle ortaya çıkabilir [230-233].



Resim 2.2. Psöriatik artrit klinik belirtileri [234]

Bazı PsA'lı hastalarında eklem dışı tutulum da gözlemlenebilir; bu hastalar, eklem dışı tutulumu olmayan hastalara göre daha uzun süre hastalıkla mücadele edebilirler. Hastaların üçte birinde bağırsak tutulumu ve oküler (konjuktivit, anterior üveit) tutulum, %28'inde kardiyovasküler tutulum, %26'sında ürogenital tutulum ve %1'inde pulmoner ve adrenal tutulum görülmektedir [235]. Bu bulgular, PsA'nın sadece eklem tutulumu ile sınırlı olmadığına ve multisistemik bir hastalık olduğuna işaret eder. Bu nedenle, PsA tanısı konmuş hastaların eklem dışı organları da düzenli olarak takip edilmelidir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. RA ve PsA arasındaki demografik ve klinik farklılıklar [236].

Özellikler	Psöriatik artrit	Romatoid artrit
Cinsiyet dağılımı E:K	1:1	1:3
Başlangıç yaşı	36-40 yıl	30-50 yıl
Eklem dağılımı	Asimetrik	Simetrik
Distal eklem tutulumu	Yaygın	Yaygın olmayan
Tutulum şekli	Bir parmağın tüm eklemleri,	Tüm eklemler aynı
Omurga tutulumu	Yaygın	Nadir
Romatoid nodüller	Yok	Yaygın
Tırnak lezyonları	Yaygın	Yaygın olmayan
Sedef hastalığı	Neredeyse her zaman	Yaygın olmayan
İlişkili HLA Aleli	HLA-B27, -B17, C0602	HLADRB ₁ 04

2006 yılında Uluslararası Psöriatik Artrit Klasifikasyonu çalışma grubu psöriatik artrit sınıflandırma kriterlerini (CASPAR) oluşturmuştur (Çizegele 2.6). CASPAR kriterlerin özgüllük ve duyarlılık değerleri %95'in üzerindedir. Hastanın CASPAR kriterlerini karşılaması için enflamatuvar artiküler hastalığa ek olarak diğer kategorilerden en az 3 puan alması gerekmektedir. Bu kriterlerin, en önemli avantajı, hastada psöriazis olmasa dahi PsA olarak sınıflandırılabilmesidir [237].

Çizelge 2.6. CASPAR kriterleri [237]

Kategori		Açıklama
Psöriazis varlığı	2	
Ailede psöriazis öyküsü	1	Hastanın birinci veya ikinci derece yakınlarında
Tırnak öyküsü	1	Onikoliz, pitting veya hiperkeratoz
RF negatifliği	1	ELISA veya nefelometrik yöntemlerle
Daktilit varlığı	1	Halen mevcut daktilit olması ya da romatolog tarafından kaydedilen daktilit öyküsü- Parmağın tamamında şişme olması
Eklem çevresinde yeni kemik oluşumu	1	Radyografide (el ve ayak) Jukstraartiküler yeni kemik oluşumu
PsA tanısı için puan ≥ 3 olmalıdır		

2.4.3. Psöriatik artrit immünopatolojisi

Hem psöriazisin hem de psöriatik artrit temel özellikleri artmış vaskülarite, doku proliferasyonu ve enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonudur. Anjiyogenez, psöriazis ve psöriatik artritte belirgin bir erken olaydır. RA ile karşılaştırıldığında, PsA sinoviyal doku örneklerinde daha fazla nötrofil infiltrasyonu ve vaskülarite, ancak daha az T lenfosit içerir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve TGF- β gibi anjiyogenez ile ilişkili faktörler, PsA'lı hastaların sinoviyal sıvısında bulunmaktadır. Anjiyopoetinler hem deri hem de sinoviyal lezyonlarda ortaya çıkabilir [238, 239].

Psöriatik artritte, mononükleer hücreler (T ve B lenfositler, makrofajlar ve plazma hücreleri) ve polimorfonükleer hücreler eklem ve epidermisin perivasküler bölgelerine infiltre olur [240]. Birkaç çalışma, PsA'daki sinoviyal hücre tiplerini romatoid artrit ile karşılaştırmıştır. FLS ve makrofajların sayıları aynıdır, ancak sinoviyal T ve plazma hücre sayıları PsA'da daha düşüktür. TNF- α , İL-1 β , İL-6 ve İL-18 gibi proenflamatuvar sitokinler, MMP'ler, adezyon molekülleri ve vasküler belirteçlerin ekspresyonu PsA ve RA'da aynı seviyededir (Şekil 2.7) [241].

PsA, spondiloartropatiler (SpA) adı verilen bir artrit grubuna aittir. Bu grupta, ankilozan spondilit, reaktif artrit, enflamatuvar bağırsak hastalığı (Crohn hastalığı ve ülseratif kolit) ile ilişkili artrit ve iyi tanımlanmış farklılaşmamış SpA (uSpA) gibi çeşitli hastalıklar bulunmaktadır. Bu hastalıklar, omurga ve çevresindeki eklemleri etkileyen enflamatuvar artritlerdir ve ortak immünolojik, genetik ve klinik özelliklere sahiptirler. SpA sinoviti, RA sinoviti ile karşılaştırıldığında vaskülarite, CD163+ makrofajlar ve polimorfonükleer lökositlerin daha yüksek olduğu; hiperplazi, lenfoid agregatlar, CD1a+ hücreler, hücre içi sitrülünlenmiş proteinler ve MHC-HC gp39 kompleksleri için ise daha düşük değerlerle karakterize edilir [236]. İnflamasyon bölgesinde çeşitli hücrelerin infiltrasyonu olduğundan, bu hücrelerin ayrı ayrı incelenmesi psöriatik artrit immünopatolojisini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

Nötrofiller

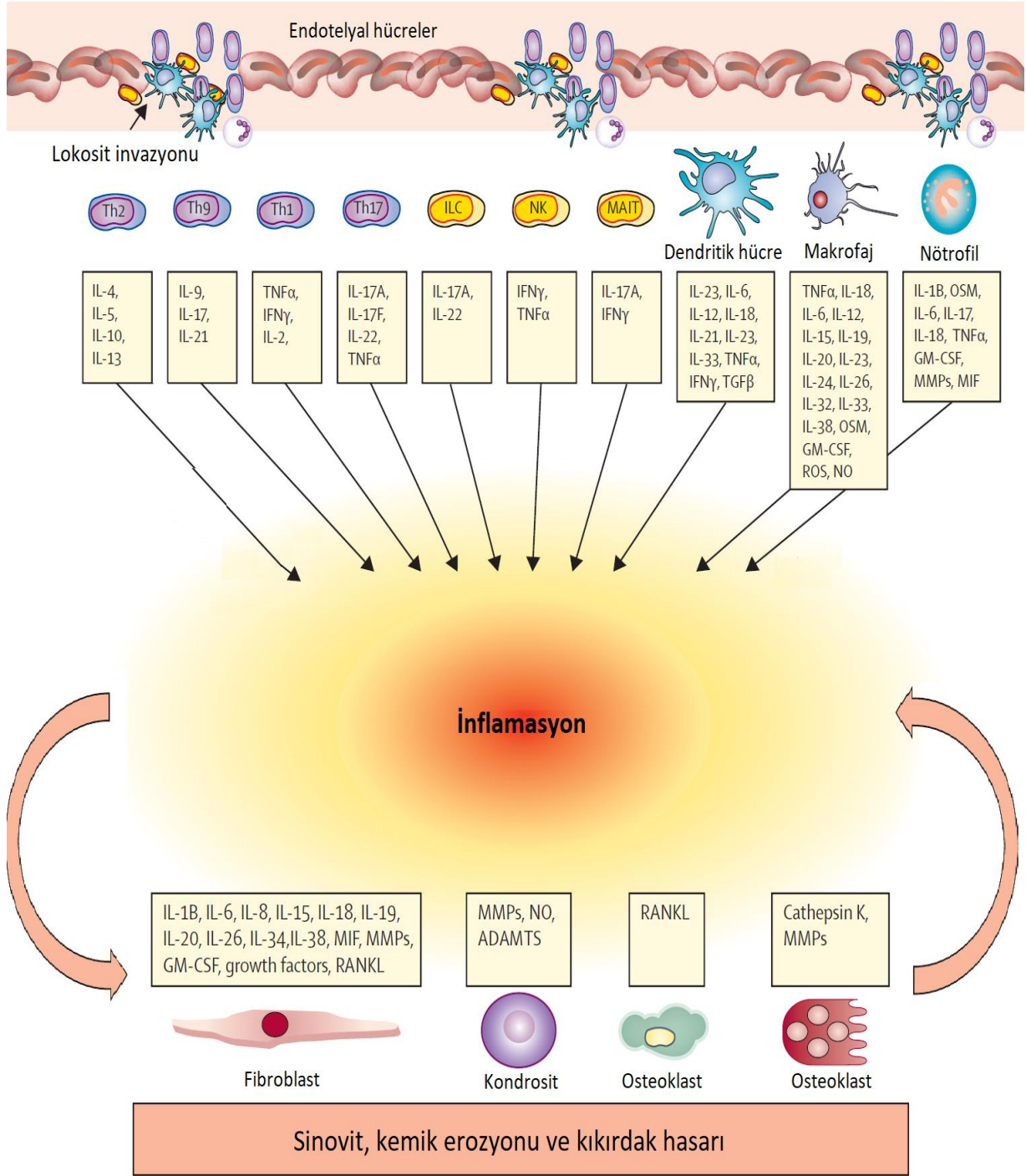
Başlangıçta, araştırmalar TH hücrelerine odaklandı ve Th1 veya Th17 bağışıklık yanıtının psöriazis ve PsA'nın en muhtemel tetikleyicisi olduğu düşünülüyordu. Ancak, İL-17'nin, nötrofiller, CD8+, $\gamma\delta$ T hücreler, NK hücreler, doğal öldürücü T hücreler (NKT), doğal lenfoid hücreler (İLC) dahil olmak üzere birçok başka hücre tarafından üretildiğine dair yeni bilgiler bu görüşü değiştirdi. PsA'da T lenfositlerin rolü tartışmalıdır. Diğer hücre tipleri arasında, PsA'lı hastaların sinoviyal dokularında T lenfositlerin infiltre olmasına rağmen, romatoid artrit ile karşılaştırıldığında daha düşük bir prevalans göstermektedir. Klinik çalışmalarda, T hücresi hedefli tedavilerin sitokin hedefli yaklaşımlardan çok daha az etkili olabileceği açıktır. Sinoviyumda oligoklonal T hücresi genişlemeleri gösterilmiştir; bu T hücresi tepkisinin devam eden enflamasyonu teşvik edebileceğini düşündürmektedir. Psöriazisli deride İL-17 ekspresyonuna ilişkin immünohistokimyasal çalışmalar, nötrofillerin ve mast hücrelerinin en sık boyanan hücreler olduğunu göstermektedir [242-245].

Birçok biyopsinin incelenmesine dayanarak yapılan çalışmalar, aktif psöriaziste Th17 hücrelerinin sayısının küçük olduğunu (<CD3+ hücrelerin %10'u) ve özellikle Munro'nun mikroabseleri mevcut olduğunda nötrofillerin sayısal olarak baskın hücre tipi olduğunu ve immüno-histokimyasal olarak İL-17'nin tespit edilebildiğini doğrulamaktadır. Bu çalışmalar nötrofiller ve mast hücrelerin, insan derisinde İL-17'yi eksprese eden ana hücre tipleri olduğunu göstermektedir. Çalışmalardan elde edilen veriler, nötrofillerin psöriaziste İL-

İL-17'nin kaynağı olduğunu öne sürmekle birlikte, İL-17'nin sentezinin, gelişimlerinin hangi aşamasında veya hangi koşullar altında gerçekleştiğini açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [246, 247]. İL-17 ailesi, İL-17A, İL-17B, İL-17C, İL-17D, İL-17E ve İL-17F izoformlarını içerir. İL-17A ve bu sitokine benzeyen İL-17F'nin ekspresyonu psöriatik sinoviyumda artmıştır ancak bugüne kadar yapılan araştırmaların büyük çoğunluğu proenflamatuvar sitokin İL-17A'ya ve daha az ölçüde İL-17F'ye odaklanmıştır. İL-17A'nın, PsA'lı hastaların ve diğer artritli hastaların sinoviyal sıvısında arttığı gösterilmiştir; aynı zamanda psöriazisten etkilenen ciltte de aşırı eksprese edilir [248].

İL-17, sinoviyal doku enflamasyonu, osteoklastogenez, kondrosit aktivasyonu, fibrinogenez ve anjiyogenezin yanı sıra TNF- α gibi proenflamatuvar sitokin ve MMP'lerin üretimi için diğer sitokinlerle (İL-1 β , onkostatin M gibi) sinerjistik olarak hareket eder ve osteoklastojenik aktiviteyi güçlü bir şekilde artırır [249, 250]. Ayrıca, İL-17 nötrofil spesifik kemokinlerin artmasını sağlayarak psöriatik lezyonun epidermisine daha fazla nötrofil toplanmasını sağlar [252]. İL-17 β -defensin, S100A7, S100A8, S100A9 gibi antimikrobiyal peptitlerinin ekspresyonunun uyararak ve keratinositlerdeki filagrin (filamentleri agregre eden protein) ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak cilt bariyerini bozar [253, 254].

İL-17 sinoviyal enflamasyona ek olarak, aşırı kemik rezorpsiyonu ve yeni kemik oluşumunun patogenezinde de rol alır. Osteoklastlar aracılığıyla gerçekleşen kemik rezorpsiyonu ve osteoblastların yeni kemik formasyonu, sağlıklı kemiklerde entegre bir süreçtir. Yüksek RANKL/osteoprotegerin oranı, osteoklastların monositlerden farklılaşmasını kolaylaştırır ve dengeyi kemik rezorpsiyonu doğru yönlendirir. PsA'lı hastalarından alınan kan numuneleri, sağlıklı kontrollerden alınanlara kıyasla osteoklast öncüllerinde belirgin bir artış sergiliyor ve PsA sinoviyumunda belirgin RANKL ekspresyonu gözlemlenmiştir. İL-17 osteoklastneogenezin temel düzenleyicisi olan RANKL'ın ekspresyonunu artırarak kemik erozyonunu teşvik eder [236, 255]. PsA için onaylanmış olan ve İL-17A'yı hedefleyen monoklonal antikolar secukinumab ve iksekizumab, periferik artriti iyileştirmiş, periferik eklem radyografik hasarının ilerlemesini inhibe etmiş, entezit ve daktilit sıklığını azaltmış ve PsA'lı hastaların fiziksel fonksiyonlarını ve yaşam kalitesini iyileştirmiştir [256-258].



Şekil 2.7. Psöriatik artritin patogeneğinde rol oynayan hücreler ve sitokinler [251]

Nötrofillerin (ve mast hücrelerinin) anjiyogenezle ilişkili olarak deri lezyonlarında rolü, 1990-2010 yılları arasında kapsamlı bir şekilde araştırılmış olmakla birlikte günümüzde de bilimsel araştırmalarda yeniden büyük ilgi görmektedir. Aktive olmuş nötrofillerin endotel hücrelerine yapışması, *in vitro* ve *in vivo* anjiyogeneze neden olabilir. Nötrofillerin bu etkisi için iki adezyon molekülü, ICAM1 ve E-selektin, ve NE gereklidir. ICAM1'in sinyalizasyonunda etki eden bir transkripsiyon faktörü olan ETS1, MMP, VEGF ve bazik fibroblast büyüme faktörün (bFGF) de sinyalizasyonunda ortak bir faktör olarak görev yapar ve proteazların transkripsiyonel aktivasyonunda rol oynar. Nötrofillerin bazı tipleri yalnızca VEGF ve diğer birçok anjiyojenik faktörü (İL-17 ve NET) salgılamakla kalmaz, aynı zamanda otokrin ve parakrin amplifikasyonu için reseptörlere de sahiptir. Bu nedenle, nötrofiller cilt hastalıklarının anlaşılmasında ve tedavisinde, sadece enflamatuvar yönlerde değil, aynı zamanda anjiyojenik yönlerde de giderek daha önemli hale gelmektedir [234].

T lenfositler

Psöriatik artritte T hücrelerini/lenfositleri hangi antijenin harekete geçirdiği henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Uzun yıllar boyunca, psöriatik artritte T hücresi sitokin ekspresyonu çalışmaları, TNF- α eksprese eden CD4+ T hücrelerine odaklanmıştır; günümüzde ise çalışmalar daha çok İL-23 ve İL-17 eksprese eden hücreler üzerindedir [259].

Th17 hücreleri, İL-6, İL-23 ve TGF- β stimülasyonu ile naif CD4+ hücrelerinden gelişir ve psöriatik cilt lezyonlarında bol miktarda bulunur [260]. Aktive Th17 hücreleri CCL2 kemokinini aşırı bir şekilde eksprese ederek nötrofillerin enflamasyonlu dokuya göç etmesini sağlar [249]. İL-17+, CCR6+ ve CCR4+ T hücrelerinin frekansları psöriazis ve PsA'lı hastalarında yükselir. PsA'lı hastalarda, İL-17+CD8+ ve İL-17+CD4+ T hücre sayıları, periferik kana kıyasla sinoviyal sıvıda daha yüksektir. PsA'da bu T hücrelerin hastalık aktivitesi ve erozyon durumu ile de korele olduğu gözlemlenmiştir [261].

İL-22 sitokini Th17 ve Th22 hücreleri tarafından eksprese edilir ve psöriatik artritli hastalarda, periferik kana kıyasla sinoviyal sıvıda artar. Psöriatik artrit patogeneğinde İL-17'ye ek olarak İL-22'nin önemli bir rolü olduğuna dair ikna edici kanıtlar bulunmaktadır ve İL-22, keratinosit çoğalması ve yeni kemik oluşumu ile ilişkilendirilmiştir [262, 263]. Hayvan modellerinde, Th17 aracılı cilt enflamasyonunun gelişimi için İL-22 gereklidir [264]. İL-17 ve İL-22'nin reseptörünü ifade eden deride yerleşik hücreler, keratinositler,

fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi hücreler, proenflamatuvar sitokinlerin, CXCL1 ve CCL20 gibi kemokinlerin ve LL-37 veya β -defensinler gibi anti-mikrobiyal peptitlerin ekspresyonunu artırarak reaksiyona girerler. İL-17 stimülasyonu keratinosit proliferasyonunu, anjiyogenezi, mast hücrelerinin, nötrofillerin ve makrofajların alımını ve aktivasyonunu artırırken, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltır ve böylece cilt bariyerinin bozulmasını destekler. İL-22 ayrıca keratinositlerin gen ekspresyonunu kontrol eder, antimikrobiyal savunma fonksiyonunu güçlendirir, farklılaşmalarını engeller ve çoğalmalarını ve hareketliliklerini artırır [265, 266].

Th9 hücreleri, İL-9 üreten bir T hücre alt kümesidir ve otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Özellikle psöriatik artritte, İL-9'in rolü önemlidir. Psöriatik artritte, sinoviyumda İL-9 sitokini üretimi artar ve Th9 hücreleri periferik kanda ve eklem sıvısında çoğalır. Bu durum, hastalık aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. İL-9, psöriatik artritte patojenik T hücresi proliferasyonunu ve hayatta kalmasını teşvik eder. Bu nedenle, İL-9, eklem enflamasyonuna katkıda bulunarak hastalık sürecine önemli ölçüde etki eder [267-270].

B lenfositler

Psöriatik artritli hastaların cildi, psöriazisli hastaların cildiyle karşılaştırıldığında, B-lenfosit varlığında farklılıklar gösterir ve psöriatik artrit epidermisinde, önemli ölçüde daha fazla HLADR+ hücresi bulunur [271].

RA ve PsA'lı hastaların sinoviyal sıvısından alınan B hücreleri, antijen sunumu ve kostimülasyonda rol oynayan molekülleri farklı şekilde eksprese edebilir. Bu durum, B hücrelerinin sadece antikör salgılamakla kalmayıp aynı zamanda antijen sunumu hücresi gibi davranabileceğini ve çeşitli otoimmün hastalıkların patogeneze katılabileceğini öne sürmektedir [272]. RA'lı hastaların sinoviyal mikro ortamından alınan B hücreleri fenotipik değişiklikler gösterir, bu da onların APC olarak hareket edebildiklerini düşündürmektedir. PsA'lı hastalarda ise sinoviyal B hücreleri hem MHC Sınıf II hem de kostimülatör moleküllerde değişiklikler sergiler, ancak RA'lı hastaların B hücrelerinde gözlemlenenlerden daha az molekül içerir. Bu bulgular, B hücrelerinin romatoid sinoviyumda lokal olarak APC gibi davranabileceğini gösterebilir. PsA'lı hastalarda, sinoviyal sıvıdan alınan B hücreleri, periferik kanla karşılaştırıldığında CD40'ta bir artış göstermektedir [273].

Makrofaj ve Dendritik hücreler

PsA'da sinoviyal sıvıda miyeloid dendritik hücrelerin plazmasitoid dendritik hücrelere oranı önemli ölçüde artmıştır. RA ve PsA sinoviyal sıvıda plazmasitoid dendritik hücreler olgunlaşmamış bir fenotip sergilemektedir. Bu olgunlaşmamış fenotip, hücrelerin sinoviyal mikroçevreye ve artritogenik antijenlere yanıt vermesine izin vererek hastalığın daha da devam etmesine neden olabilir. Psöriatik artritteki immatür dendritik hücreler, TLR2'nin yukarı ifadesini gösterir ve bu fenotip, TNF- α , İFN- γ ve İL-12 üretimiyle birlikte bir Th1 hücre tepkisini indükler [274, 275].

Aktive edilmiş makrofajlar sinoviyumda çeşitli proenflamatuvar mekanizmaları teşvik eder. M1 makrofajları klasik olarak aktive edilir ve proenflamatuvardır ve enfeksiyona karşı konak savunmasında merkezi bir rol oynarlar. Diğer yandan, M2 makrofajları alternatif olarak aktive edilir ve antienflamatuvar tepkiler ile doku yeniden yapılanması ile ilişkilendirilirler. Proenflamatuvar sitokinlerin makrofajlar tarafından bol miktarda salgılanması, psöriatik artrit belgin bir özelliğidir. Makrofajlar ayrıca büyük miktarlarda MMP'ler ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) salgılar, antijenleri T hücrelerine ve B hücrelerine sunar ve kemik rezorpsiyonunu yönlendirir [276].

Makrofajlar, TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin kaynağıdır ve miyeloid DC'lerin etkisini artırarak Th17 hücrelerinin polarizasyonunu destekler. PsA'lı hastalarda muhtemelen aktive monosit/makrofaj sistemi nedeniyle artan S100A8/A9 seviyeleri bulunmaktadır [277].

İL-23 ve İL-12, dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından üretilir ve Th1 ve Th17 hücre alt gruplarının farklılaşmasından ve gelişmesinden sorumludur. İL-12p40, İL-12 ve İL-23 sitokinlerin ortak bir alt birimidir. Bu alt birimi içeren sitokinlerin derideki patolojik enflamatuvar süreçlerinde rol alabilir [278]. Psöriazis ve PsA'nın patogeneze yönelik mevcut baskın model, altta yatan genetik ve çevresel faktörlerin, dendritik hücreleri İL-23 ve İL-12'yi salgılamaya teşvik etmesi ve Th1 Th9, Th17 ve Th22 hücreleri aktive etmesidir [279].

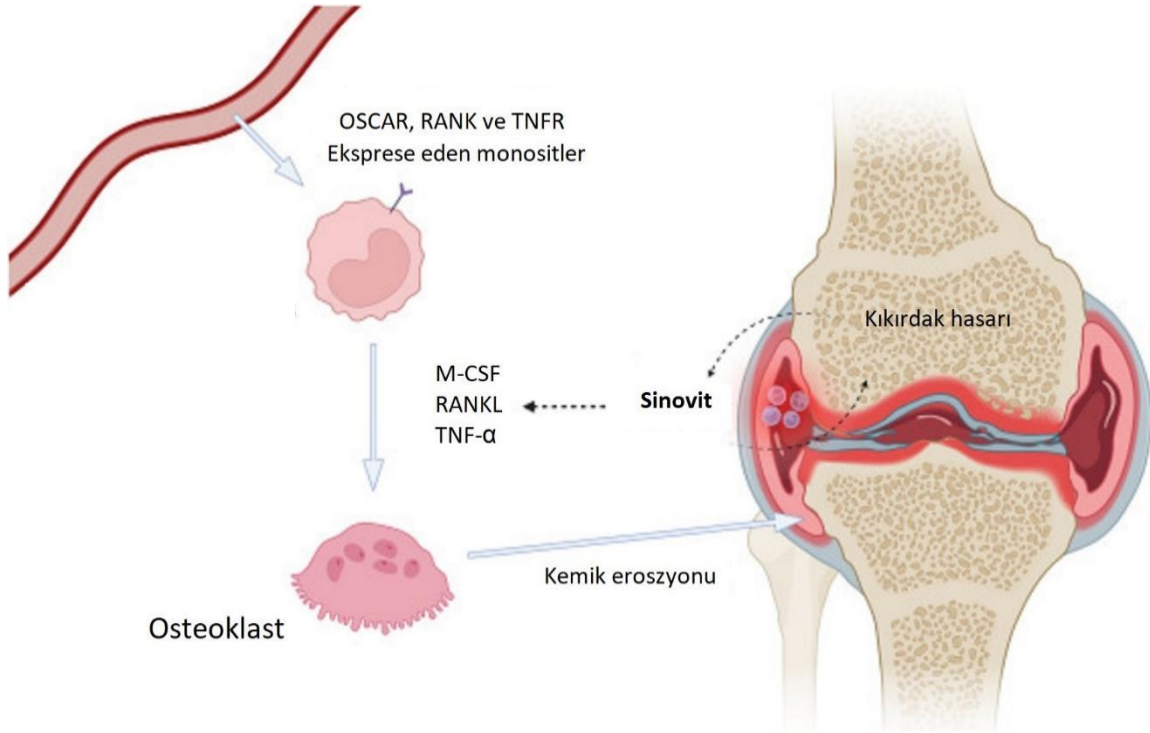
Tendon ve bağların kemiğe bağlandığı bölgede belirgin aksiyal ve periferik enflamasyonun gelişimi, anti-İL-23 antikor tedavisi ile iyileştirilebilir. İL-23, diğer sitokinlerin (TNF, İL-23

ve İL-17) ekspresyonunu artırarak pannus oluşumu ve eklem erozyonuna katkıda bulunur. PsA'lı hastaların, osteoartrit hastalarına kıyasla sinoviyal sıvılarında daha yüksek düzeyde İL-22 olduğu bulunmuştur ve İL-22'nin, PsA eklemlerinde fonksiyonel olarak aktif olduğu belirlenmiştir. İL-23, İL-17 ve İL-22'nin birlikte, PsA'daki eklem patolojisinin sinoviyal enflamasyon, eklem erozyonu ve yeni kemik oluşumu olan üç bileşenine de katkıda bulunabileceği görülmektedir [262, 280].

TNF, makrofajlar, dendritik hücreler, keratinositler, FLS ve Th hücreleri gibi, çeşitli hücreler tarafından üretilir. İltihaplı sinoviyumda aktive edilmiş makrofajlar TNF'nin en önemli kaynağıdır. TNF'nin farklı hücreler tarafından üretilmesi, bu sitokinin hastalığın hem erken hem de kronik evrelerinde rol oynayabileceğini göstermektedir [281]. Lezyonlu ciltte TNF- α üretimi sağlıklı ciltle karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksektir [282]. Keratinositler TNFR1'i eksprese eder ve dolayısıyla TNF'ye yanıt verir. Bu hücrelerde TNF ile stimülasyonu sonucunda doku yeniden yapılanması, hücre motilitesi, hücre döngüsü ve apoptoz indüklenebilir [283]. TNF- α , PsA'da anjiyogenez osteoklastların aktivasyonu, FLS'lerin çoğalması ve bu hücrelerden İL-6, İL-8 ve MMP'lerin salınması gibi çeşitli patolojik olaylara katkıda bulunur [284, 285].

TNF- α , monositler üzerinde OSCAR ifadesini indükleyebilir ve RANKL'in etkilerini güçlendirebilir. OSCAR'ın ligandına bağlanması, RANK liganda ek olarak monositlerin osteoklasta farklılaşmasını teşvik eden genleri aktive etmek için ikinci bir sinyal sağlar. Bu işlem sonucunda TNF- α osteoklastogenezi ve kemik rezorpsiyonu teşvik eder (Şekil 2.8) [286].

TNF inhibitörlerinin klinik fayda sağladığını, yaşam kalitesini iyileştirdiğini ve yapısal hasarı azalttığını gösteren bulgular, bu sitokinin çeşitli enflamatuvar hastalıkların immünopatogenezinde merkezi bir rol oynadığını doğrulamaktadır. TNF inhibitörlerinin etkileri ilk olarak RA'lı hastalarda ve daha sonra PsA'lı hastalarda gösterilmiştir. PsA'da, TNF inhibitörlerinin, periferik artrit, entezit, daktilit, deri ve tırnak psöriazisi, aksiyal artrit ve üveit dahil olmak üzere hastalığın çeşitli alanlarında oldukça etkili olduğu gösterilmiştir [287-291].



Şekil 2.8. Osteoklastogenezde OSCAR ligandın rolü [292]

2.4.4. Psöriazisin psöriatik artrite ilerlemesini sağlayan model

Psöriazis ve PsA birbiri ile ilişkili klinik özelliklere sahip hastalıklardır. Vakaların çoğunda, plakların gelişimi artritın başlangıcından yıllar önce gerçekleşir. Bu nedenle, eklem enflamasyonu ve hasarıyla sonuçlanan olayların deride ortaya çıkan anormal bir immün yanıtta kaynaklandığını varsaymak mantıklıdır.

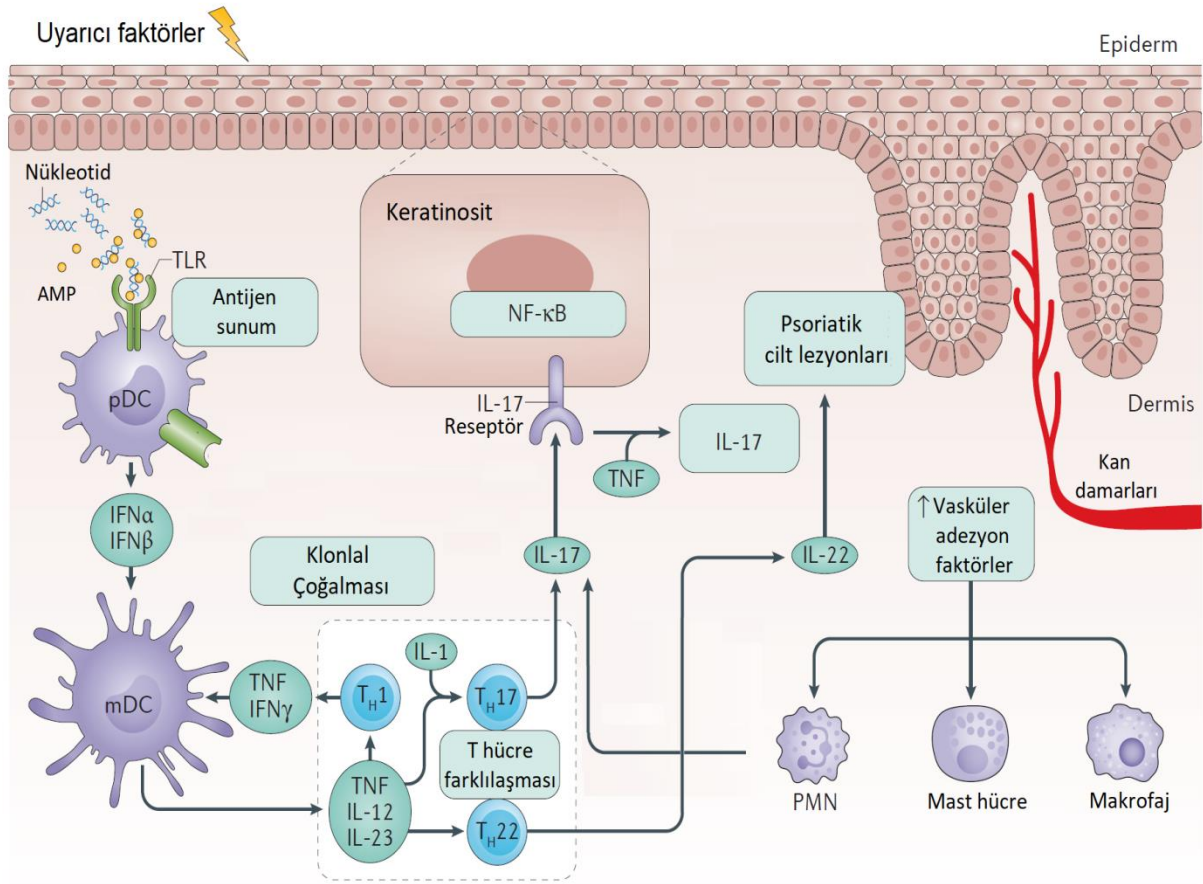
Mevcut model, hayvan modelleri ve insan dokularından elde edilen verilere dayanarak, erken olayların, stres altındaki keratinositlerin salgıladığı DNA'nın antibakteriyel peptid LL-37 ile etkileşime girmesiyle teşvik edildiğini göstermektedir. DNA+LL-37 kompleksi, pDC hücreler üzerinde bulunan TLR-9'a bağlanır ve İFN-α salınımını tetikler. İFN-α, miyeloid dendritik hücrelerin uyarılmasını sağlar. Miyeloid dendritik hücrelerin İFN-α tarafından aktivasyonunu, bu hücrelerin lenf düğümüne göç etmesini sağlar. Lenf düğümünde DC'ler, naif T hücrelerinin Th1 ve Th17 hücrelerine farklılaşmasına ve cilde göç etmesine neden olur. Dermise girdikten sonra Th1 hücreleri İFN-γ ve TNF-α salgılar, Th17 hücreleri ise kemokinler, TNF-α, İL-1, İL-17 ve İL-22'yi üretir (Şekil 2.9) [293-295].

İL-17A, İL-22 ve TNF-α birlikte, kutanöz İL-19 sentezini ve salınımını uyarır. İL-19,

keratinositlerde anti-bakteriyel proteinlerin üretimini teşvik eder, bunlar arasında S100A7, S100A8, S100A9 bulunur. İL-19 varlığında İL-1 β , İL-20, CXCL-8, MMP-1, gibi faktörlerin üretimi artar. LL-37 tarafından uyarılan ve psöriatik plaklarda bol miktarda bulunan İL-36 γ , nötrofiller için kemoatraktan olan İL-8 ve CXCL1'in üretimine neden olur. Psöriatik plaklarda oluşan nötrofil toplulukları, "Munro abseleri" olarak adlandırılır. İL-17A ve TNF- α birlikte OSCAR ve RANKL'ın ifadesini indükleyerek monositlerin osteoklasta farklılaşmasına dolayısıyla osteoklastogeneze ve kemik rezorpsiyona neden olabilir [296,263].

Tırnak erozyonları psöriaziste sıkça görülür ve PsA'da daha da yaygındır. Klinik gözlemler distal interfalangeal eklemler artriti ile PsA'daki tırnak erozyonları arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu durum, tırnaklardaki enflamasyonun, komşu distal eklemlerdeki enflamasyonu teşvik edebileceğini düşündürmektedir. İL-23, anormal kemik yeniden yapılanmasını yönlendirebilen ve dolayısıyla psöriatik tırnak hastalığı ile eklem hasarını birbirine bağlayan kritik bir sitokindir. Bu sitokin, DNA-LL-37 kompleksi tarafından aktive edilen dendritik hücreler tarafından büyük miktarlarda üretilir [297, 298]. Bu nedenle, İL-23'ün rolü, psöriatik tırnak hastalığı ile eklem hastalığı arasındaki ilişkinin anlaşılmasında önemli olabilir.

Genel olarak bu modele bakıldığında, keratinositlerin salgıladığı DNA'nın LL-37'ye bağlanması, dendritik hücrelerde İFN- α salınımını artırır, bu da TNF ve İL-23/Th17 sitokinlerinin salınmasına yol açar. Bu, PsA patogenezinin ilişkin yeni bir hipotezin temel özelliğidir. NET'lerin ana bileşeni olan DNA ve NET'lerde bulunan HMGB1 ve LL-37 gibi immün sistem uyarıcı moleküller B hücrelerini ve plazmasitoid dendritik hücreleri aktive edebilir [295, 296]. Bu nedenle, PsA'nın NETozis'in incelenmesi ve bu hastalıkta NET ve bileşenleri ile plazmasitoid dendritik hücrelerin aktivasyonu, bu hücrelerde İFN- α salınıp salınmadığının araştırılması, bu hastalığın patofizyolojisini daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.



Şekil 2.9. Psöriazis immünopatogenezinde keratinositlerin salgıladığı DNA'nın rolü [299]

2.4.5. Psöriatik artrit patogenezinde NETozis'in rolü

PsA hastalarında NETozis'in rolüne odaklanan bir çalışmada, MPO-DNA kompleksi serumda enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu çalışma, MPO-DNA kompleksinin PsA ve psöriazis hastalarının serumunda yükseldiğini ve psöriatik hastalık yükü ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Buna ek olarak PsA'lı hastalarda tedaviden sonra serum MPO-DNA düzeyinin azaldığı gözlemlenmiştir [300].

Psöriazisli hastaların periferik kanlarında normal sağlıklı kontrollere ve egzamalı hastalara kıyasla daha yüksek miktarda NETotik hücre bulunduğunu ve bu NETotik hücre miktarının psöriazis şiddeti ile paralel seyrettiği ortaya konulmuştur [16].

Psöriazis sırasında deride nötrofil ve mast hücreleri tarafından IL-17 salınımı uyarılmaktadır. Bu sitokinin özellikle NETozis sırasında salınmaktadır. Lin ve arkadaşları nötrofillerin ve

mast hücrelerinin, psöriazis cilt lezyonlarında hücre dışı tuzakların oluşumu yoluyla İL-17'yi salgıladığını göstermişler. Bu çalışma psöriazis deri lezyonlarında İL-17'nin Th17 hücreleri tarafından üretildiğine dair önceki inancın aksine, İL-17'nin çoğunluğunun mast hücreleri (esas olarak degranülasyon yoluyla) ve nötrofiller (esas olarak NETozis yoluyla) tarafından üretildiği göstermiştir [301]. Nötrofillerden salınan İL-17A, keratinositleri CCL20'yi eksprese etmek için uyarır. Bu kemokin Th17 hücrelerini enflamasyonlu bölgeye çeker ve sonunda pozitif bir geribildirim döngüsü oluşturarak psöriatik lezyonların gelişimine katkıda bulunur [302].

NET'ler T hücrelerini doğrudan tetikleyebilir ve ayrıca sitoplazmik nötrofil antijenlerinin miyeloid dendritik hücrelere transferine aracılık edebilir [303, 304].

2.5. LL-37 (Katelisidin)

Nötrofiller, monositler ve makrofajlar ve epitel hücreleri tarafından üretilen antimikrobiyal peptidler (AMP) bakteri, mantar, protozoa ve virüs enfeksiyonlarına karşı doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir parçasını oluştururlar. AMP'ler uzunluklarına, disülfid köprülerinin varlığına veya yokluğuna göre birkaç gruba ayrılır ancak yapı ve işlevsellik açısından çok heterojen bir grup olmalarına rağmen genel olarak küçük, katyonik ve amfipatik yapıda aminoasit bileşenleridir. Antimikrobiyal aktivitelerin yanı sıra, bu peptitlerin bazıları sitokinlerin salınımını, kemotaksiyi, proteaz inhibisyonu, antijen nötralizasyonunu ve yara iyileşmesini etkileyebilirler. AMP'ler antifungal veya antibakteriyel etkilerini mikrobiyal membran ile etkileşime girip ve spesifik membran proteinlerinin sentezinin inhibe ederek, hücre membranı geçip hücre içi yapıları hedefleyerek, DNA'nın kırılmasına neden olarak ve hidrojen peroksit üretimini artırarak ortaya çıkarırlar. Üç ana AMP sınıfı katelisidin (LL-37), β -defensinler ve S100 proteinleridir. AMP'lerin doğal bağışıklıktaki rolü, enfeksiyonlar, enflamatuvar tepkiler, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi durumlardaki biyolojik mekanizmalar üzerindeki etkileri, otoimmün hastalıklarda seviyeleri ve aktiviteleri gibi konular günümüzde yoğun olarak araştırılan alanlardır [305-307].

2.5.1. LL-37'nin yapısı ve ekspresyonu

LL-37, katyonik antimikrobiyal peptit (CAMP) gen bölgesinden hCAP18 adı verilen bir proprotein şeklinde sentezlenir. Proteinaz 3, proteaz tarafından hCAP18 proteininin C-terminal ucundan proteolitik olarak ayrılır ve antimikrobiyal özellik gösteren aktif peptit yapısına dönüşür. LL-37 peptidi 37 (LLGDDFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES) aminoasitten oluşur ve başlangıç kısmında iki adet lösin aminoasiti bulunduğu için bu ismi almıştır [308].

LL-37, amfipatik α -helikal oligomerik peptit yapısına sahiptir, bu da bakteriyel membran veya diğer anyonik bileşenlerle etkileşime girmesine izin verir [309]. Hidrofobik kısım, pozitif yüklü kalıntılardan oluşur ve LPS, genetik materyal ve bakteri hücre duvarı gibi negatif yüklü moleküllerle etkileşime girer. N-terminal alfa sarmalı peptit, oligomerizasyonundan, proteolitik dirençten, kemotaksiden ve hemolitik aktiviteden sorumludur; C-terminal alfa sarmalı ise antimikrobiyal etkide rol oynar [305].

LL-37 keratinositler, hava yolu, oküler yüzey, üreme organları ve kolondaki epitel hücreleri, miyelositler, mezenkimal stromal hücreler gibi birçok doku hücresinde eksprese edilir. Bağışıklık sisteminde ise NK hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, DC'ler ve makrofajlar LL-37 üretir [310]. Bu peptidin ana kaynağı olan nötrofil, aktif olmayan hCAP18 öncüsünü sentezler ve ikincil veziküllerde depolar. Uyarım sonrasında, bu peptidler degranüle olur ve hücre dışı ortamında proteaz 3 tarafından proteolitik olarak parçalanarak aktif hale gelirler [308]. LL-37 ve diğer AMP'lerin ekspresyonu, proenflamatuvar sitokinler ($\text{IFN-}\gamma$, IL-17A , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-36}\gamma$), vitamin D reseptör agonistleri, büyüme faktörleri ve LPS, gibi faktörler tarafından tetiklenebilir [311, 312].

2.5.2. LL-37'nin efektör fonksiyonları

LL-37'nin doğuştan gelen bağışıklıktaki fonksiyonu bu peptidin bakteri, mantar ve virüslere karşı birincil savunmadaki rolü nedeniyle son derece önemli olduğu gösterilmiştir. Enflamasyon bölgelerindeki yüksek LL-37 konsantrasyonları, hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı koruma sağlar [313, 314].

LL-37, bakteriyel hücre duvarının dış tabakasına ulaştığında, çeşitli moleküllerle kompleksler oluşturur ve monomerlerin periplazmik boşluğa geçişine izin verir. Bu, gözeneklerin oluşmasına ve sitoplazmik materyalin hücre dışı ortama salınmasına olanak tanır [311]. Ayrıca LL-37, virüslerin ve bakteriyel plazmidlerin çift sarmallı ribonükleik asidini (dsRNA) endozomal TLR'lere iletebilir. Plazmid DNA'sı, hücre içine girdiğinde, TLR-7 ve TLR-9'u uyararak tip I İFN üretimini tetikler. Viral enfeksiyonlarda, doku enflamasyonu ve hasarı, virüslerden ve nekrotik hücrelerden dsRNA'nın salınmasına neden olur; dsRNA LL-37 ile bir kompleks oluşturarak TLR-3'ü aktive eder ve transkripsiyon faktörü NF- κ B ve interferon düzenleyici faktör 3'ün (İRF3) çekirdeğe translokasyonuna neden olarak tip I İFN üretimini artırır [315].

Enfekte olmuş epitel hücrelerinden LL-37 salgılanır; nötrofiller, eozinofiller, monositler ve DC hücrelerin enflamasyon bölgesine infiltrasyonunu sağlar. Ayrıca LL-37, monositleri, fibroblastları ve epitel hücrelerini İL-8 salgılamaya teşvik eder [316, 317].

LL-37, keratinositlerin göçünü tetikleyerek epidermal büyüme faktörü reseptörünün transaktivasyonu yoluyla yara iyileşmesi, yeniden epitelleşme ve yara izi oluşumu süreçlerine katılır [317].

LL-37, antimikrobiyal fonksiyonlarının yanı sıra, salgılandığı mikro ortama bağlı olarak antienflamatuvar etkiler göstererek immünomodülatör görevi görür. LL-37'nin etkinliği doza bağlıdır ve immün modülatör etkilerini antimikrobiyal etkilerine göre daha düşük konsantrasyonlarda gerçekleştirir [319].

LL-37'ye maruz kaldıktan sonra bağırsak epitel hücrelerinden salınan TGF- β , yara iyileşmesine yardımcı olan epitel hücrelerinin göçünü indükleyerek önemli kemotaktik özellikler sergiler. Bu nedenle enfeksiyon veya yaralanma bölgesinde salınan LL-37, enflamatuvar bir tepkiyi teşvik etme ve yara onarımını başlatma kapasitesine sahiptir [320].

LL-37, LPS aracılı TLR-4 sinyalini azaltır ve LPS varlığında dendritik hücrelerde ve makrofajlarda TLR-4 reseptörünün fonksiyonunu inhibe ederek daha düşük proenflamatuvar sitokin üretimi seviyelerine yol açar [321].

2.5.3. LL-37'nin otoimmün hastalıklardaki rolü

LL-37'nin rolü, solunum sistemi, cilt ve intestinal sistemi tutan otoimmün hastalıklarda, vaskülitler ve enflamatuvar hastalıklarda çeşitli çalışmalarda incelenmiştir.

Psöriaziste LL-37'in rolü bu tezde daha önce tartışılmıştı. 2007 yılında Lande ve arkadaşları LL-37'nin, psöriatik deride doğuştan gelen immün yanıtların temel tetikleyicisi olduğunu ve AMP ile psöriazis patogenezi arasındaki ilk bağlantıyı sağladığını göstermiştir. Aslında, LL-37 uyarıcı olmayan öz DNA'yı güçlü bir pDC tetikleyicisine dönüştürerek bu hücreleri İFN- α üretmek için uyarır ve doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık yanıtları arasında iletişim kurar [294]. Psöriaziste hastalık aktivitesi ile serum LL-37 seviyesi ve ilişkili proenflamatuvar sitokin seviyelerinin korele olduğu gösterilmiştir [322]. Plak sedef hastalığı (plak tipi psöriazis) olan hastalarda hem CD4+ hem de CD8+ LL-37-reaktif T hücreleri tanımlanmıştır. LL-37 peptidleri, MHC sınıf I'e bağlanarak CD8+ T hücreleri ve dendritik hücrelerin HLA-DR'sine bağlanarak CD4+ T hücreleri aktive eder. Dolaşımdaki LL-37'ye özgü T hücrelerinin sayısı, hastalık aktivitesi ile önemli ölçüde ilişkilidir; bu da onların hastalık patogenezinin aktif katkı sağladıklarını düşündürmektedir [323].

Nötrofiller, enflamasyonun merkezinde olabilecek DNA, RNA ve LL-37'nin erken kaynağıdır. RNA ve LL-37 kombinasyonu, nötrofiller tarafından algılanan bir enflamatuvar ligand üretir ve bu kompleksten gelen sinyaller nötrofillerden RNA-LL-37 ve DNA-LL-37 komplekslerin salınmasına neden olur. Aktive edilmiş NETozis yapan nötrofiller, hem RNA-LL-37'yı hem de DNA-LL-37'yı serbest bırakarak kendi kendine yayılan enflamasyonu tetikleyebilir ve bağışıklık aktivasyonu kontrolden çıkabilir [324].

LL-37, keratinositlerde farklı nötrofillerin toplanması ve aktivasyonu için önemli olan proenflamatuvar ve immün düzenleyici sitokinlerin sentezlenmesi ve salınması için uyarır. Bu sitokinler arasında İL-6, İL-18, İL-20, Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) bulunmaktadır. Ek olarak LL-37, psöriatik keratinositlerde nötrofillerin ve Th1/17 lenfositlerin toplanmasına katkıda bulunan CCL2, CCL5, CXCL10 ve CCL20 kemokinlerini indükler [325, 326].

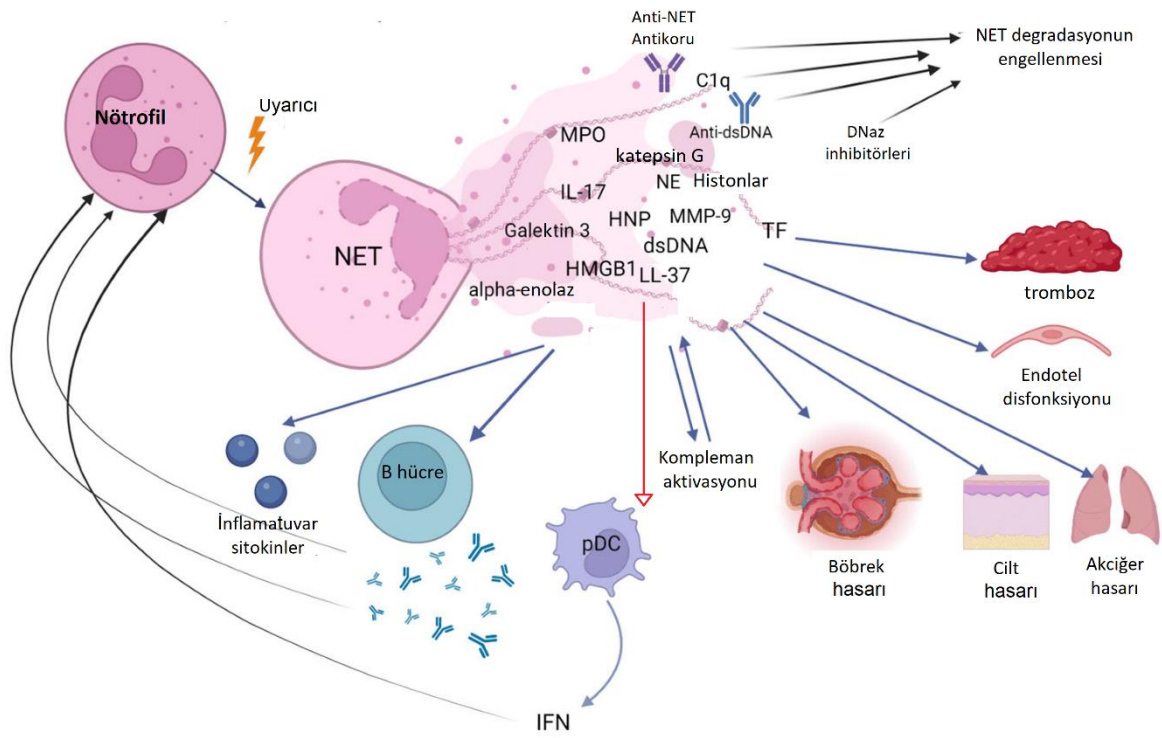
LL-37 seviyesinin PsA'lı hastaların sinoviyal sıvılarında oldukça yüksek olduğu ve PsA'da bu peptidin anti-LL-37 otoantikorlarının hedefi olduğu gösterilmiştir. Nötrofiller

degranülasyon ve/veya NETozis sonucunda AMP'leri hücre dışı ortama salar. NET'lerin LL-37'nin salınmasına neden olması SLE'de tarif edilmiştir. Bu bulgular, nötrofillerin PsA'da lokal otoantijenlerin kaynağı olarak önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir [327].

SLE'de NETozis sonucunda nötrofiller tarafından LL-37/öz-DNA kompleksleri bol miktarda salınır ve TLR9 yoluyla pDC'yi verimli bir şekilde aktive ederler. SLE hastalarında, NET'lerde hem öz DNA'ya hem de LL-37'ye karşı otoantikorlar geliştiği bulunmuştur. Bu bulgular LL-37 komplekslerin B hücresi aktivasyonunu tetikleyen otoantijenler olarak da görev yapabileceğini göstermektedir. SLE hastalarında nötrofiller, sağlıklı bağışçılardan gelenlere kıyasla daha fazla NET salgırlar. Dahası, bu salınım, antimikrobiyal peptid otoantikorları (AMP otoantikorları) tarafından daha da uyarılır; bu durum, SLE'de immünojenik komplekslerin sürekli salınımı için bir mekanizma öne sürmektedir [217].

Tip-I İFN'ların yüksek seviyeleri, monositlerin dendritik hücelere farklılaşmasını indükler. Dendritik hücelerde oto-reaktif B hücelelerini ve T hücelelerini uyararak SLE'de otoimmüniteyi teşvik eder. SLE'de NETozis sonucunda salınan DNA/LL-37 kompleksleri yalnızca TLR9 aracılığıyla poliklonal B hücresi aktivasyonunu tetiklemekle kalmaz, aynı zamanda B hücresi reseptörüne de bağlanarak NET'e özgü, oto-reaktif B hücelelerini uyarır. Bu mekanizma aracılığıyla, SLE hastalarında artmış NET oluşumu, patojenik anti-LL-37 antikorlar üreten NET'e özgü, oto-reaktif B hücelelerinin aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu bulgular, NET'lerin TLR9 ve B hücresi reseptörlerinin aktivasyonunu tetiklediği ve SLE'de anti-NET otoantikor üretimine yol açtığı nötrofiller ile B hüceleri arasında bir bağlantı olduğunu öne sürmektedir [328].

LL-37 antikorlarına ek olarak, SLE hastalarının %45'inde LL-37'ye özgü T hüceleri bulunmaktadır. Ancak psöriatik Th17 hücelelerinin aksine, bu LL-37'ye özgü T hüceleri, CXCR5/Bcl-6 ve İL-21 ifadesi ile T-foliküler yardımcı hücre (TFH) benzeri bir fenotipe sahiptir, dolayısıyla patojenik antikorların üretilmesinde rol aldıkları düşünülmektedir (Şekil 2.10) [329].



Şekil 2.10. SLE patogeneğinde nötrofil ekstraselüler tuzaklarının rolü [144]

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmaya Alınan Grupların Demografik ve Klinik Özellikleri

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı ile Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı-Romatoloji Bilim Dalı'nın ortak çalışması olarak planlandı (çok merkezli multidisipliner çalışma).

Bu çalışma Başkent Üniversitesi, Romatoloji Bilim Dalı tarafından ayaktan poliklinik şartlarında izlenen ve psöriatik artrit ve romatoid artrit tanısı konmuş hastalardan alınan periferik venöz kan örneklerinin ve kandan ayrılan serum örneklerinin analizleri ile yürütüldü. Psöriatik artrit ve romatoid artrit için vaka tanımına uyan 18 yaşından büyük hastalar çalışmaya dahil edildi.

RA tanısı için American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative (RMID: 20699241) kriterleri kullanıldı [190].

PsA tanısı için CASPAR (Classification Criteria for Psoriatic Arthritis) kriterleri (RMID: 16871531) kullanıldı [237].

Kontrol grubu olarak 18 yaşından büyük, herhangi bir romatolojik, enfeksiyöz veya malign hastalığı ve/veya immün yetmezliği olmadığı bilinen sağlam sağlıklı kişilerden alınmış kan ve serum örnekleri kullanıldı.

Çalışma süresince toplam 76 kişi çalışmaya alındı ancak kandan nötrofil izolasyonu aşamasında izole edilen nötrofil sayısının 1 000 000 / ml'den daha az olması veya nötrofil saflığının %80'in altında olması nedeniyle 10 hasta çalışma dışı bırakıldı. Sonuç olarak; bu tez çalışmasında çalışma grubunda 22 psöriatik artrit tanısı konmuş hasta, 22 romatoid artrit tanısı konmuş hasta ve 22 sağlam sağlıklı kişinin verileri analiz edildi.

Hastalara ve sağlıklı kontrol grubundaki kişilere çalışma hakkında gerekli bilgi ayrıntılı bir şekilde anlatıldı ve çalışmaya dahil edilmeden önce yazılı onamları alındı. Kontrol ve hasta gruplarından araştırmaya katılan bireylerin yaş, cinsiyet, psöriatik artrit ve romatoid artrit tanı yaşı, uygulanan immünosüpresif tedaviler, sigara ve alkol tüketim durumu olgu rapor formunda kaydedildi.

Hasta ve kontrol gruplarına ait laboratuvar değerleri için çalışmaya katılan kişilerin çalışmaya alındıkları anda yapılan tetkiklerine ait sonuçlar kullanıldı ve hastaların RF ve Anti-CCP pozitiflik durumu, periferik kandaki nötrofil yüzdesi ve beyaz kan hücreleri ile ilgili tam kan sayımı (CBC) değerleri kaydedildi.

Çalışmaya kabul kriterlerine göre dahil edilen PsA ve RA'lı hastaların, uzman hekim tarafından ayrıntılı fizik muayeneleri ile hastalık belirtileri ve laboratuvar bulguları dikkate alınarak hastalık şiddeti değerlendirildi.

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

Psöriatik artrit hastaları için hastalık şiddeti DAPSA (Disease Activity in Psoriatic Arthritis) skoruna göre, romatoid artrit hastaları için ise DAS 28 (Disease Activity Score 28) skoruna göre belirlendi.

Psöriatik artritli hastalar DAPSA skoru ve klinik bulgularına göre 2 grupta, romatoid artritli hastalar ise DAS 28 skoru ve klinik bulgularına göre iki grupta toplandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmaya dahil edilen örneklerin gruplandırılması

Gruplar	Hastalar	DAPSA/ DAS28	Sayı
Grup I	Ağır PSA	DAPSA > 28	11
Grup II	Hafif-Orta PsA	DAPSA ≤ 28	11
Grup III	Ağır RA	DAS 28 > 5,1	11
Grup IV	Hafif-Orta RA	DAS 28 ≤ 5,1	11
Sağlam sağlıklı	-	-	22

3.2. Araştırmaya Dahil Olma ve Dışlama Kriterleri

Herhangi bir otoimmün/otoenflamatuvar hastalığı olan, psöriatik artrit ve romatoid artrit dışında bir otoimmün hastalığı bulunan, herhangi bir malignansisi olan, immün yetmezlik veya enfeksiyöz bir hastalığı bulunan ve NET formasyonunu inhibe eden ilaçları kullanan (Rapamisin, Lapatinimib, Cyclosporine A, Aspirin, Heparin, Metformin, probiyotik, vitamin D, Azithromycin, Chloramphenicol ve Gentamicin) kişiler çalışmadan çıkarıldı [178].

Nötrofil izolasyonu aşamasında izole edilen nötrofil sayısı 1000 000/ml'den az olan veya nötrofil saflığı %80'in altında olan örnekler de çalışmadan çıkarıldı.

18 yaşından büyük, daha önceden tanı konulmuş ve izlenmekte olan psöriatik artrit ve romatoid artrit hastaları ve sağlıklı gönüllüler çalışmaya alındı.

3.3. Örneklerin Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı polikliniğinde, çalışmaya katılan 22 RA, 22 PsA hastasından ve 22 sağlıklı gönüllüden araştırmaya katılmaya karar verdikleri zaman:

- a. NETozis çalışması için; heparin içeren tüpe 5 ml periferik venöz kan örneği alındı.
- b. LL-37 çalışması ve PsA'lı hastalardan alınan serumların sağlıklı kontrollerde oluşan NET'leri degrade edebilme kabiliyetini araştırmak için antikoagülan içermeyen jelli serum ayırma tüpüne 5 ml periferik venöz kan örneği alındı.

Alınan periferik venöz kan örnekleri, TC sağlık bakanlığı Biyolojik Örnek Taşıma Genelgesine uygun olarak gerekli saklama kapları ile 1 saat içinde Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirildi.

ELISA çalışmalarında kullanılmak üzere jelli serum ayırma tüpüne alınan periferik venöz kan örnekleri oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra, 28°C'de 1000xg'de 20 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Her hastadan en az 1 ml serum elde edildi. Serumlar örnekleri alikuatlar şeklinde 2 ml'lik kriyo tüplere aktararak LL-37 antimikrobiyal peptid düzeyinin ELISA metodu ile ölçümünde kullanılıncaya kadar Gazi Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarında -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

Nötrofil hücrelerinin kısa yarılanma ömrü göz önüne alındığında, nötrofil izolasyonun aynı gün içinde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, periferik venöz kan örnekleri heparin içeren tüplere alındıktan ve laboratuvara aktarıldıktan sonra, nötrofil izolasyonunun ardından, NETozis ölçümü, ticari bir NETozis kiti kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Deneyisel çalışmalar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı İmmünoloji Laboratuvarı'nın araç ve gereç olanakları kullanılarak yapıldı.

3.4. Alınan Örneklerden Nötrofillerin İzolasyonu

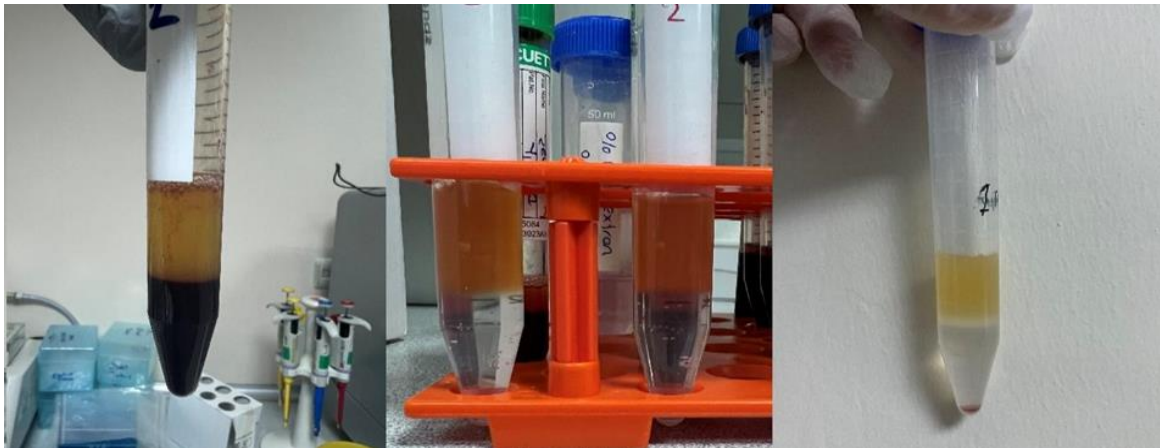
Nötrofil hücreler periferik venöz kandan dekstran sedimantasyonu ve dansite gradienti separasyon yöntemi ile izole edilmiştir [330, 333].

3.4.1. Nötrofillerin izolasyonun temel prensibi

Heparin içeren kan alma tüpüne periferik venöz kan örneği alındıktan sonra, nötrofil 24-48 saate kadar canlı kalabilir. Nötrofilin kültürdeki nispeten kısa ömrü göz önüne alındığında, kandan izolasyonu ve deneylere gecikmeden başlanması büyük önem arz etmektedir. İnsan periferik kan nötrofilin izolasyonu, dekstran destekli rozet oluşumu ve hipotonik lizizi kullanılarak kırmızı kan hücrelerinin (RBC) temizlenmesini içerir. Nötrofil, dansite gradyanı yöntemiyle Ficoll kullanılarak PBMC'den ayrılır. Bu yöntemle kandan %95'in üzerinde saflıkta nötrofiller izole edilebilmektedir. Belirli bir molekül ağırlığına sahip dekstran viskoziteyi artırma ve matriks oluşturma yeteneğiyle, kan örneği ile karıştırıldığında, hücrelerin etrafında bir matriks oluşturur ve bu matriks içindeki hücrelerin çökmesine yardımcı olur. Bu sayede, hücrelerin çökmesi sağlanarak, istenmeyen hücrelerin ayrılması ve izole edilmesi mümkün olur [330, 333].

3.4.2. Nötrofillerin izolasyonun prosedürü

1. 5 ml heparin içeren tüpe alınan periferik venöz kan alt üst edildikten sonra 15 ml polipropilen falcon tüplerine aktarıldı. Üzerine 1ml %10'luk dekstran eklenendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında hareket ettirilmeden 1 saat inkübasyona bırakılarak faz ayrımı olması ve sedimentasyon yoluyla lökositler eritrositlerden ayrılması sağlandı.
2. Faz ayrımından sonra üstteki faz pastör pipeti ile çekilerek alındı ve 2,5 ml oda sıcaklığındaki Ficoll solüsyonu üzerine, iki faz oluşturacak şekilde yeni bir tüpe aktarıldı (Resim 3.1). Nötrofilleri mononükleer hücrelerden ayırmak için 4 °C'de 20 dakika boyunca 516xg'de santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası süpernatant tamamen atıldı ve 3 ml kırmızı kan hücresi lizis solüsyonu (0,5 ml PBS ve 2,5 ml distile su) eklendi. Çökmüş hücre pelleti köpük portüp üzerinde sürüklenerek dağıtıldı ve 45 saniye boyunca alt üst edilerek homojen hale gelene kadar karıştırıldı.
4. Karışımın üzerine 2 ml %3 lük NaCl eklendi ve altüst edilerek karıştırıldı. Karışım 4°C'de 290xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası süpernatant tamamen atıldı. Hücre pelleti üzerine 500 µl NET test tamponu eklendi ve çökmüş hücre pelleti tüp sporu üzerinde sürüklenerek dağıtıldı ve homojen hale gelene kadar karıştırıldı.
6. Nötrofil miktarını belirlemek için Gazi Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Hematoloji Laboratuvarı'nda Beckman Coulter hematometre ile tam kan sayımı (CBC) testi yapıldı.



Resim 3.1. Nötrofil izolasyon protokolünün üç ana basamağı

3.4.3. İzole edilen nötrofillerin canlılık oranının belirlenmesi

İzole edilen nötrofillerin canlılığını tespit etmek amacıyla tripan mavisi dışlama yöntemi kullanıldı. Besiyeri içerisinde homojen bir süspansiyon halinde bulunan nötrofiller ve %0,04'lüki tripan mavisi 1:1 oranında karıştırıldı ve 1-2 dakika boyunca inkübe edildi.

Boyanmış hücre süspansiyonundan 10µl, Nauber lamına koyularak ışık mikroskobu altında 40x büyütme incelendi. 4 köşe karesi ve orta karede (toplam 5 büyük kare) mavi renkte boyanmış hücreler “ölü”, renksiz görünen hücreler “canlı” kabul edilerek sayıldı. 5 büyük karedeki toplam ve canlı hücrelerin ortalamasını alındı. Nötrofillerin %95'inin canlı olduğu tespit edildi. Canlılık oranı, canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünüp, elde edilen sonucun 100 ile çarpılarak hesaplandı. Canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

$$\text{Hücre Sayısı} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

Eş. 3.1

3.4.4. Nötrofillerin izolasyonunda kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

Nötrofillerin izolasyonunda kullanılan cihazlar, malzemeler ve kimyasallar Çizelge 3.2'de belirtildi.

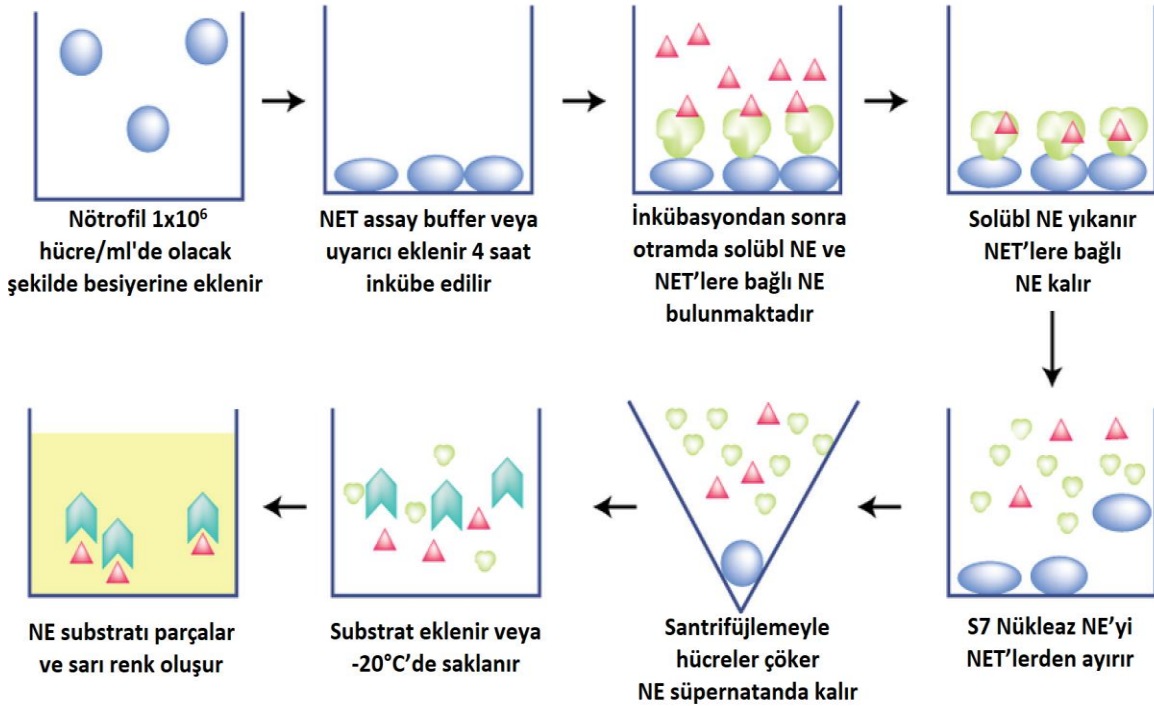
Çizelge 3.2. Nötrofillerin izolasyonunda kullanılan cihazlar, malzemeler ve kimyasallar

Malzeme ve Kimyasallar adı	Marka
Polipropilen Falkon Tüpü (15 ml)	NEST
Polipropilen Falkon Tüpü (50 ml)	ISOLAB
Serolojik Pipet (1000µl)	Discovery comfort
Steril Filtreli Pipet Ucu (1000µl)	ISOLAB Tips
Elektronik Hassas Terazi	Ohaus
Distile Su Cihazı	RENTRO-16000 DP
Pastör Pipeti	GREINER
Soğutmalı Santrifüj	NUVE NF 3000
Vorteks	Biosan
Ficoll	CAPRICORN / Cat No: Lym-B
Fosfat Tamponlu Solüsyon (PBS)	CAPRICORN / Cat No: PBS-1A
Sodyum Heparinli Tüp (9 ml) (455084)	VACUETTE® 455084
Dextran	SIGMA / Cat No:D4751
Sodium Chloride	
Hematometre Cihazı	Beckman Coulter Dxh 900
Kriyo Tüp (2 ml)	GREINER
Tripan Mavisi	GİBCO

3.5. Nötrofillerde NET Formasyon ve Degradasyonun Ölçümü

3.5.1. NET formasyonun ölçümünün temel prensibi

NET formasyonu hazır ticari Cayman NETosis Test Kiti (NETosis Assay Kit, Item No: 601010; Ann Arbor, Michigan, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak çalışıldı ve spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Cayman'ın NETosis Test Kiti, DNA'ya bağlı değildir çünkü DNA salınımı NETosis'ten bağımsız olarak gerçekleşebilir. Bu kitin çalışma prensibine göre, izole edilmiş nötrofiller çeşitli uyarıcılarla (PMA, LPS, vb.) uyarılarak NETosis indüklenir. Uyarıcı kullanılmadan da spontan NETosis ölçümleri yapılabilir. 4 saat inkübasyondan sonra NET oluşumunun ardından ortamda çözünür (soluble) NE ve NET'lere bağlı NE bulunmaktadır. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi bağlanmamış NE yıkanarak uzaklaştırılır. S7 nükleaz, NET'leri degrade eder ve DNA'ya bağlı proteinlerin serbest kalmasını sağlar. Besi yerine NE tarafından seçici olarak bölünen bir substrat eklenir. Nötrofil elastaz substratı parçaladığında, 405 nm'de ışığı emen 4-nitroanilin ürünü oluşur. Spektrofotometre ile 405nm dalga boyunda ölçüm yapılarak nötrofil elastaz aktivitesi belirlenir. Elde edilen veriler analiz edilerek NETosis'in derecesi ve yoğunluğu değerlendirilir.



Şekil 3.1. NET formasyon ölçümünün diyagramı

3.5.2. NET formasyon ölçümünde hazırlanan çözeltiler ve hazırlanış biçimleri

1. NET test tampon (assay buffer) solüsyonu hazırlamak için 20 ml RPMI 1640 ve 20µl Kalsiyum Klorür (1M) karıştırıldı ve içine 0,2g donmuş Sığır Serum Albümini (BSA: Bovine Serum Albumin) çözüldü. Bu çözelti taze olarak kullanıldı.
2. 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. S7 Nükleaz Testi Reaktifi hazırlamak için 37,5 U/ml'lik bir çalışma solüsyonu oluşturuldu. Bunun için 2,5µl S7 Nükleaz (15.000 U/ml'de sağlanır) 1ml önceden ısıtılmış NET test tampon solüsyonu ile dilüe edildi. Bu çözelti taze olarak kullanıldı.
4. Nötrofil Elastaz Substratı hazırlamak ve 80 numuneyi tahlil etmek için, 500 µl nötrofil Elastaz Substrat 14,5 ml PBS (1:30 seyreltme) ile dilüe edildi. Bu çözelti taze olarak kullanıldı.

3.5.3. NET formasyonu ölçümü

1. Elde edilen nötrofiller 1×10^3 hücre/µl = 1×10^6 hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde NET test tampon solüsyonu kullanılarak resüspanse edildi.
2. Düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropakta her örnek için 2 kuyucuğa 100µl süspansiyondan eklendi; bunlardan bir tanesinde nötrofil uyarımı yapıldı, diğerinde uyarım yapılmadı. Nötrofilleri uyarmak istenilen kuyucuğa 50 µl PMA (1nM) eklenirken, uyarmak istenilmeyen kuyucuğa ise 50 µl NET test tampon solüsyonu eklendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.
3. Uyarım ve NET formasyon tamamlandıktan sonra, kuyucuklardan süpernatantlar yavaşça aspire edildi.
4. Kuyucuklar, 100 µl önceden ısıtılmış NET test tampon solüsyonu ile 2 kez yavaşça yıkandı ve NET ile ilişkili olmayan çözümler nötrofil elastaz ortadan kaldırıldı.
5. Her bir kuyucuğa 200µl seyreltilmiş S7 Nükleaz eklendi. S7 Nükleazın NET'leri degrade

edip nötrofil elastazın DNA'dan ayrılmasını sağlamak için 37°C'de 45 dakika boyunca inkübe edildi.

6. Nükleazı etkisiz hale getirmek için her bir kuyucuğa 2µl EDTA (500 mM) eklendi.

7. Hücresel kalıntıların çökmesini sağlamak için Süpernatant U tabanlı plate'e aktarıldı ve mikrolarka santrifüjü ile beş dakika boyunca 300xg hızında santrifüj edildi.

8. Süpernatantlar ayrı bir doku kültürü plağına aktarıldı.

9. Çalışmamızda, hastaların kan örnekleri kademeli olarak toplandığı için, numuneler bu aşamada kuyucukların üzeri kapatılarak, nötrofil elastaz ölçümünde kullanılıncaya kadar - 20°C'de derin dondurucuda saklandı.

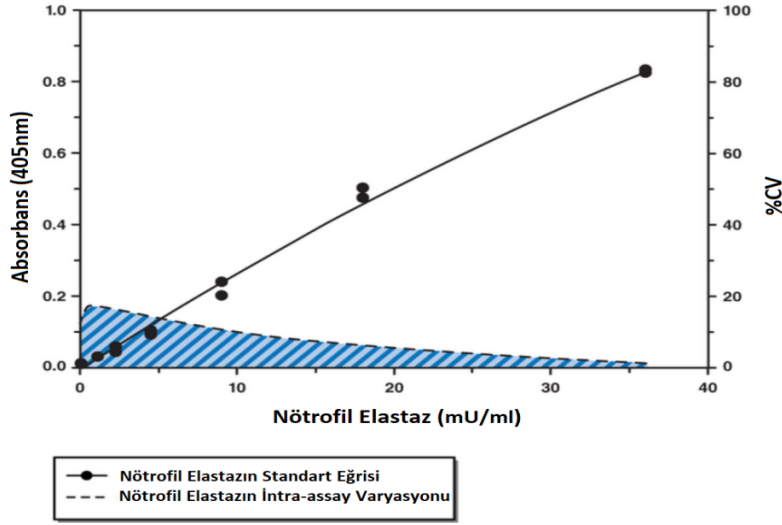
10. Seyreltici hazırlamak için 20 ml NET test tampon solüsyonuna 400 µl EDTA eklendi. İnsan Nötrofil Elastaz Test Reaktifini (18 U/ml) kullanarak standart bir eğri çalıştırmak için sekiz adet 15 ml'lik falkon tüpü alındı ve #1'den #8'e kadar etiketlendi. 1 numaralı tüpe 5ml önceden ısıtılmış seyreltici 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. Tüp #1'den 1 ml alındı ve tüp #2'ye aktarıldı. Tüp #7'ye kadar seri dilüsyon yapıldı. 8 numaralı tüpe herhangi bir standart eklenmedi. Standartlar ve örnekler 37°C'ye ısıtıldı.

11. Kuyucuklara 100 µl örnek ve standartlar eklendi. Her kuyucuğa 100µl Substrat eklendi. Mikroplağın üzeri kapatılarak 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi.

12. 405 nm dalga boyunda filtre ile otomatik ELISA okuyucu ile her kuyucuğa ait optik dansiteler ölçüldü.

13. Verilerin hesaplanması için, bilgisayar ortamında dikey eksenindeki her standart için elde edilen optik yoğunluk, yatay eksene yerleştirilerek standart bir eğri oluşturuldu. Bu eğri kullanılarak örneklere ait hesaplamalar yapıldı.

Nötrofil elastaz standart eğrisi Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Nötrofil elastazın standart eğrisi

3.5.4. NET degradasyon testi

Sağlıklı donörden yeni izole edilmiş kontrol nötrofiller, 1×10^6 hücre/ml'de olacak şekilde NET test tampon solüsyonu kullanarak yeniden süspanse edildi. Düz tabanlı 96 kuyucuklu (çukurlu) mikropiğin her kuyucuğuna 100µl kontrol nötrofilleri içeren süspansiyon eklendi. Nötrofillerin yapışmalarını sağlamak için 37°C'de 30 dakika süreyle inkübasyon yapıldı. Kontrol nötrofillerine, NETozis'i indüklemek için 50 µl PMA (25 nM) eklendi ve 4 saat inkübe edildi.

NET'leri içeren kuyucuklar, PsA'lı hastalardan alınan %10 serum ile 37 °C'de 6 saat boyunca inkübe edildi. PsA'lı hastaların serumunda bulunan nükleaz NET'leri degrade ettikten sonra, kuyucuklardan süpernatant yavaşça aspire edildi. Kuyucuklar yavaşça iki kez 100µl önceden ısıtılmış NET test tampon solüsyonu ile yıkandı ve PsA'lı hastaların serumunda bulunan nükleaz tarafından degrade olan NET'lerden salınan çözünür NE ortadan kaldırıldı. Hasta serumu ile degrade olmayan NET ölçümü için her kuyucuğa 200µl S7 Nükleaz (100 U/ml) eklendi. S7 Nükleazın hasta serumu ile degrade olmayan NET'leri degrade edip nötrofil elastazın DNA'dan ayrılmasını sağlamak için mikropiğin 37°C'de 45 dakika inkübe edildi. Nükleazı etkisiz hale getirmek için her bir kuyucuğa 2µl EDTA (500 mM) eklendi ve NET formasyonu ölçümü prosedüründe yapıldığı şekilde PsA'lı hasta serumunu tarafından degrade olmayan NET'ler ölçüldü. PsA hastasının serumu tarafından parçalanmayan NET'lerin toplam NET'ten çıkarılmasıyla, degradasyon miktarı hesaplandı ve hasta serumunda bulunan nükleaz tarafından NET degradasyon seviyesi yüzde olarak ifade edildi.

3.5.5. NET formasyon ölçümünde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

NET formasyon ölçümünde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler Çizelge 3.3'te belirtildi.

Çizelge 3.3. NET formasyon ölçümünde kullanılan cihazlar, malzemeler ve kimyasallar

Malzeme ve Kimyasallar adı	Marka
Elektronik Hassas Terazî	Ohaus
Vorteks	Biosan
Kriyo Tüp (2 Ml)	GREINER
-20° C Derin Dondurucu	Arçelik
+4° C Buzdolabı	Hotpoint Ariston
Mikroplaka Kapatıcı	
İnkübatör 37±0,5 °C	Faithful Instrument (Hebei)
Serolojik Pipet (1000µl)	Discovery comfort
Serolojik Pipet (200µl)	Discovery comfort
Serolojik Pipet (100µl)	Discovery comfort
Serolojik Pipet (10µl)	Discovery comfort
Serolojik Pipet (2µl)	Discovery comfort
Steril Filtreli Pipet ucu (1000µl)	ISOLAB Tips
Steril Filtreli Pipet ucu (200µl)	ISOLAB Tips
Steril Filtreli Pipet ucu (100µl)	ISOLAB Tips
Steril Filtreli Pipet ucu (20µl)	ISOLAB Tips
Steril Filtreli Pipet ucu (10µl)	ISOLAB Tips
Düz tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültürü plağı	ISOLAB Tips
Mikroplaka Santrifüjü	Digicen 21 R
Spektrofotometre	BioTek
RPMI 1640	SEROX / Cat No: SLR563
Fosfat Tamponlu Solüsyon (PBS)	CAPRICORN / Cat No: PBS-1A
NETozis Test Kiti	Cayman Chemical, Item: 601010
PMA (1 mM) Test Reaktifi	Cayman Chemical, Item: 400145
S7 Nükleaz Testi Reaktifi	Cayman Chemical, Item: 601011
EDTA (500 mM) Test Reaktifi	Cayman Chemical, Item: 601012
Nötrofil Elastaz Substratı	Cayman Chemical, Item: 601013
İnsan Nötrofil Elastaz Testi Reaktifi	Cayman Chemical, Item: 601014
Dana Serum Albümini (BSA: Bovine Serum Albumin)	Cayman Chemical, Item: 400086
Kalsiyum Klorür (1 M)	
96 Kuyucuklu Mikroplak	Cayman Chemical, Item: 400087

3.6. ELISA Yöntemiyle Serum LL-37 Seviyelerinin Belirlenmesi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda hasta ve kontrol gruplarından elde edilen serum örneklerinde LL-37 düzeyleri sandviç ELISA metodu ile ticari bir ELISA Kiti (Elabscience® Human LL-37 (Antibacterial Protein LL-37) ELISA Kit, Cat No: E-EL-H2438, Houston, Teksas, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda çalışılmıştır.

LL-37 düzeyi için kitin lineer ölçüm aralığı 1,56-100 ng/ml ve minimum ölçülebilir seviye 0,94 ng/ml olarak belirtilmiştir.

3.6.1. Serum LL-37 ölçümünün çalışma prosedürü

1. Periferik venöz kan örnekleri oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra, 28°C'de 1000xg'de 20 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi ve kriyoviallerde 1ml'lik alikuatlara ayrılarak çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı. Çalışmadan hemen önce -80°C'de derin dondurucudan çıkartılarak oda sıcaklığında çözünmeleri sağlandı. Kit bileşenleri de oda sıcaklığına getirildi.
3. Referans Standard (100ng), 1 ml standart seyreltici ile çözülerek 100 ng/ml'lik bir stok standart solüsyonu hazırlandı. Stok standart çözeltisinden standart seyreltici çözelti kullanılarak 7 farklı yoğunlukta (100ng/ml, 50ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml ve 1,56 ng/ml) standartlar elde edildi. Standart seyreltici çözelti ile (0 ng/ml) sıfır standart hazırlandı. 750 ml Yıkama Tamponu hazırlamak için 30 ml konsantre yıkama tamponunu 720 ml distile su ile seyreltilti.
5. Standart solüsyonları ve numunelerden 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Plaka kapayıcı ile kapatılarak 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan sıvı boşaltıldı, her kuyucuğa hemen 100 µl biyotinile yakalayıcı antikor solüsyonu eklenip, plak kapayıcı ile mikropalakğın üzeri kapatıldıktan sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
7. Kuyucuklardan solüsyon boşaltıldı, mikropalaka yıkayıcı ile 350 µl yıkama çözeltisi kullanarak 3 kez yıkandı.
8. Her kuyucuğa 100µl HRP konjugat solüsyonu eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

9. Kuyucuklardan solüsyon boşaltıldı, 350µl yıkama çözeltisi kullanarak 5 kez yıkandı.
10. Her kuyucuğa 90µl substrat solüsyonu eklenildi. Mikroplağın üzeri yapışkanlı kapak ile kapatıldıktan sonra 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
11. Kuyucuklara 50µl durdurma solüsyonu eklenip, sıvının maviden sarı rengine döndüğü gözlemlendi.
12. Durdurma çözeltisi eklenmesinin ardından, 450 nm filtrede otomatik ELISA okuyucusu ile her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.
13. Verilerin hesaplanması için, bilgisayar ortamında dikey eksenindeki her standart için elde edilen optik yoğunluk, yatay eksene yerleştirilerek standart bir eğri oluşturuldu. Bu eğri kullanılarak örneklere ait hesaplamalar yapıldı.

3.6.2. Serum LL-37 ölçümünde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

Serum LL-37 ölçümünde kullanılan cihazlar, malzemeler ve bileşenleri Çizelge 3.4'te belirtildi.

Çizelge 3.4. LL-37 ölçümünde kullanılan cihazlar, malzemeler ve kimyasallar

Malzeme ve Kimyasallar adı	Marka
Jelli Serum Ayırma Tüpü (8 ml)	Ayset, Lot: 10191
Kriyo Tüp (2 ml)	Greiner
Falkon Tüpü (15 ml)	Nest
Vorteks	Biosan
-80° C Derin Dorundurucu	SANYO
+4° C Buzdolabı	Hotpoint Ariston
İnkübatör 37±0,5 °C	Faithful Instrument (Hebei)
Serolojik Pipet (1000µl)	Discovery comfort
Serolojik Pipet (200µl)	Discovery comfort
Steril Filtreli Pipet Ucu (1000µl)	ISOLAB Tips
Steril Filtreli Pipet Ucu (200µl)	ISOLAB Tips
Spektrofotometre	BioTek
ELİSA Plak Yıkayıcısı	Algen Diagnostik-combiwash
Masaüstü Santrifüj	Hermle Z 216
Soğutmalı Santrifüj	NUVE NF 3000
Distile Su Cihazı	RENTRO-16000 DP
LL-37 ELİSA Kiti	Elabscience®, Cat No: E-EL-H2438

3.7. İstatistiksel Analiz

Sürekli sayısal değişkenlere ait verilerin normale yakın dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile varyansların homojenliği varsayımının sağlanıp sağlanmadığı ise Levene testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler sürekli sayısal değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (25. yüzdilik-75.yüzdilik) biçiminde ifade edilirken kategorik değişkenler olgu sayısı ve yüzde (%) şeklinde gösterildi.

Parametrik test istatistiği varsayımlarının sağlandığı sürekli sayısal değişkenler yönünden gruplar arasındaki farkların önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Student's t-testi ile ikiden fazla bağımsız grup arasındaki farkların önemliliği ise Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirildi. Parametrik test istatistiği varsayımlarının sağlanmadığı sürekli sayısal değişkenler yönünden gruplar arasındaki farkların önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testi ile ikiden fazla bağımsız grup arasındaki farkların önemliliği ise Kruskal Wallis testiyle incelendi. Tek-Yönlü Varyans Analizi veya Kruskal Wallis test istatistiği sonuçlarının önemli bulunması halinde söz konusu farka neden olan durum(lar) post-hoc Tukey HSD veya Dunn-Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılarak tespit edildi

Romatoid artrit ve psöriatik artrit grupları içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden farkın önemliliği Wilcoxon İşaret testiyle değerlendirildi. Sağlıklı kontrol grubu içerisinde ise uyarılmış nötrofillerde, uyarılmamış nötrofillerde ve PsA serumu ile kültür edilmiş nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden farkın önemliliği Friedman testiyle incelendi. Friedman test istatistiği sonucunun önemli bulunması halinde ise yine Dunn-Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durum(lar) tespit edildi.

Kategorik verilerin analizlerinde Fisher Freeman Halton testi kullanıldı. Öte yandan sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit grupları içerisinde uyarılmış, uyarılmamış nötrofillerde NETozis ve uyarılmış-uyarılmamış nötrofiller arasındaki NETozis farkı ile LL-37 ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olup olmadığı Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testi kullanılarak araştırıldı.

Verilerin analizinde IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM Corporation, Armonk, NY, US)

yazılımı kullanıldı. Aksi belirtilmedikçe $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Fakat olası tüm çoklu karşılaştırmalarda Tip I hatayı kontrol etmek amacıyla Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.

Gruplar arasında uyarılmış veya uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden Tek-Yönlü Varyans (One-Way ANOVA) analizine göre 0,50'lik bir etki büyüklüğü dikkate alındığında gruplar arasındaki farkların %85 güç ve Bonferroni düzeltmesine göre %2,5 yanılma düzeyinde istatistiksel olarak önemliliğini test edebilmek için çalışmaya en az 57 (grupların her birine 19'ar) olgunun dahil edilmesi öngörülmüştür. 0,50'lik etki büyüklüğüne klinik öngörüler doğrultusunda karar verilmiştir. Olası veri kayıpları göz önünde bulundurularak belirtilen sayıdan %15 daha fazla olacak şekilde 66 kişinin çalışmaya dahil edilmesi planlanmıştır. Örneklem genişliği hesaplamaları G*Power 3.0.10. (Franz Faul, Universität Kiel, Kiel, Almanya) paket programında yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Alınan Grupların Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışma süresince toplam 76 kişi çalışmaya dahil edilmiş ancak kandan nötrofil izolasyonu aşamasında izole edilen nötrofil sayısının 1 000 000/ml'den az olması veya nötrofil saflığının %80'in altında olması nedeniyle 10 hasta çalışma dışı bırakılmıştır. Son olarak çalışma grubunda 22 psöriatik artrit tanısı konmuş hasta, 22 romatoid artrit tanısı konmuş hasta ve 22 sağlıklı kişinin verileri analiz edilmiştir.

Psöriatik artritli hastaların yaş ortalaması $47,9 \pm 16,3$, romatoid artritli hastaların yaş ortalaması $62,9 \pm 12,0$ ve kontrol grubunun yaş ortalaması $45,6 \pm 12,7$ olarak saptandı. Gruplar arasında yaş ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ($p < 0,001$), söz konusu farka neden olan durum; sağlıklı kontrol ve psöriatik artrit gruplarına göre romatoid artrit grubunun yaş ortalamasının daha yüksek olmasıydı. ($p < 0,001$ ve $p = 0,005$). Hastaların cinsiyet dağılımına bakıldığında PsA'lı hastaların %18,2'sinin (4) erkek, %81,8'inin (18) kadın, RA'lı hastaların %9,1'inin (2) erkek, %90,9'unun (20) kadın olduğu görüldü. Kontrol grubunun ise %36,4'ü (8) erkek, %63,6'sı (14) kadındı. Gruplar arasında kadın-erkek dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark bulunmadı ($p = 0,106$).

Sigara ve alkol kullanım öyküleri gruplar arasında benzerdi. Sağlıklı kontrol, RA'lı ve PsA'lı hasta gruplarının arasında periferik venöz kandan izole edilen, sırasıyla, lökosit ve nötrofil sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark tespit edilmedi ($p = 0,068$ ve $p = 0,059$).

Hastaların periferik venöz kanından izole edilen nötrofil yüzdesine bakıldığında, RA'lı hastalarda %93,4, PsA'lı hastalarda %94,0 ve kontrol grubunda %93 oranında nötrofil izole edildi. Bu yönden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık tespit edilmedi ($p = 0,635$).

Çizelge 4.1'de gruplara göre olguların demografik özellikleri ve izole edilen lökosit ölçümleri yönünden yapılan karşılaştırmalar yer almaktadır.

Kandan izole edilen ve morfolojik inceleme için metilen mavisi ile boyanan nötrofillerin görüntüsü Resim 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Gruplara göre olguların demografik özellikleri ve izole edilen lökosit ölçümleri

	Sağlıklı kontrol (n=22)	Romatoid artrit (n=22)	Psöriatik artrit (n=22)	p- değeri
Yaş (yıl) *	45,6±12,7 ^a	62,9±12,0 ^{a,b}	47,9±16,3 ^b	<0,001 †
Cinsiyet				0,106‡
Erkek	8 (%36,4)	2 (%9,1)	4 (%18,2)	
Kadın	14 (%63,6)	20 (%90,9)	18 (%81,8)	
Sigara öyküsü	1 (%4,5)	0 (%0,0)	1 (%4,5)	n/a
Alkol öyküsü	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	n/a
İzole edilen WBC x10³ (uL) *	9,24±10,01	13,79±17,56	6,85±6,73	0,068¶
İzole edilen WBC x10³ (uL) **	6,45 (2,37-11,42)	9,15 (5,82-16,60)	5,25 (3,65-8,30)	0,068¶
İzole edilen nötrofil (%) *	91,70±4,86	92,99±3,87	92,63±4,61	0,635¶
İzole edilen nötrofil (%) **	93,0 (90,4-94,8)	93,4 (89,8-96,4)	94,0 (90,4-96,2)	0,068¶
İzole edilen nötrofil sayısı x10³ (uL) *	8,61±9,52	13,33±17,16	6,65±6,46	0,059¶
İzole edilen nötrofil sayısı x10³ (uL) **	5,9 (2,2-10,8)	8,4 (5,6-15,9)	5,1 (3,9-7,6)	0,059¶

Tanımlayıcı istatistikler; * ortalama ± standart sapma ve ** medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) biçiminde gösterildi., † Tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), ‡ Fisher Freeman Halton testi, ¶ Kruskal Wallis testi, n/a: Değerlendirme yapılmadı. ^a Sağlıklı kontrol grubu ile romatoid artrit grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), ^b Romatoid artrit grubu ile psöriatik artrit grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p=0,005).

Psöriatik artrit grubuna göre romatoid artrit grubunun ortalama tanı yaşı istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti ($p=0,008$).

PsA'lı hastalar DAPSA skoru ve PASI skoruna göre 2 grupta, RA'lı hastalar ise DAS 28 skoruna göre iki grupta toplandı.

PsA ve RA grupları arasında hastalık şiddeti yönünden olguların dağılımı bire bir aynıydı. Öte yandan PsA grubunun medyan PASI skoru 0,40 (25.yüzdelik=0,20 ve 75.yüzdelik=0,80) olarak saptandı.

RA ve PsA grupları arasında; tüm WBC sayısı ve dolaşımda nötrofil (%) düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark yoktu ($p=0,196$ ve $p=0,807$).

Hastaların CRP düzeylerine bakıldığında, RA'lı hastaların CRP ortalaması 6,55 mg/l, PsA'lı hastaların CRP ortalaması ise 3,00 mg/l olarak bulundu. Bu yönden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark tespit edilmedi ($p=0,303$).

Romatoid artrit grubunda medyan RF düzeyi 89,0 U/ml (25.yüzdelik=47,75 U/ml ve 75.yüzdelik=113,50 U/ml) olup RF bakılabilen 19 olgunun 12'sinde RF pozitif. RF için normal değer 20 IU/ml'nin altı olarak tanımlanmıştır.

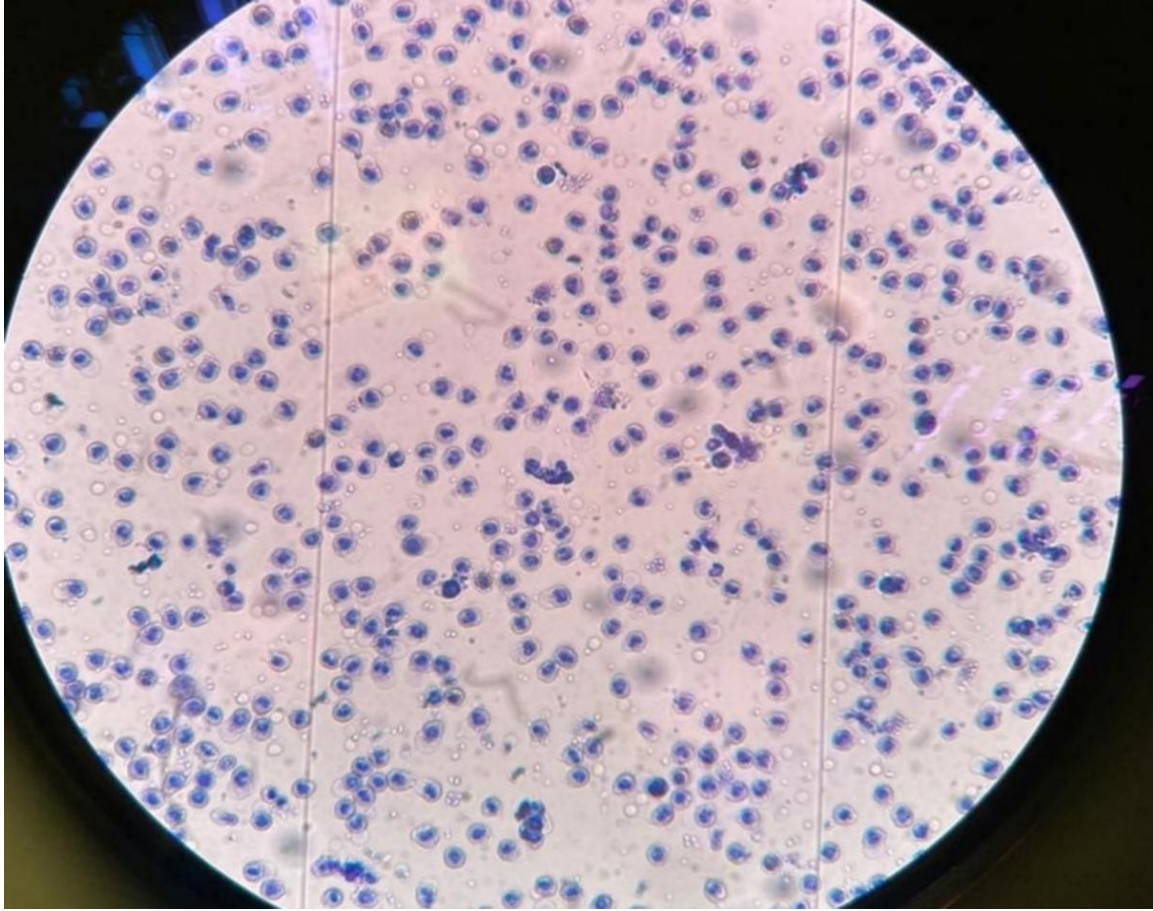
RA grubunda medyan Anti-CCP antikor düzeyi 195,0 IU/ml (25.yüzdelik=81,0 IU/ml ve 75.yüzdelik=214,25 IU/ml) olup Anti-CCP antikor düzeyi ölçülebilen 19 olgunun 13'ünde AntiCCP antikor pozitif. Anti-CCP için normal, negatif değer 0-15 IU/ml olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2'de RA ve PsA hasta gruplarında olguların klinik özellikleri ve laboratuvar ölçümleri açısından yapılan karşılaştırmalar verilmiştir.

Çizelge 4.2. Romatoid artrit ve psöriatik artrit hasta gruplarında olguların klinik özellikleri ve laboratuvar ölçümleri

	Romatoid artrit (n=22)	Psöriatik artrit (n=22)	p-değeri
Tanı yaşı (yıl) *	57,6±13,3	44,3±15,	0,008†
Hastalık şiddeti			n/a
Hafif-Orta	11 (%50,0)	11 (%50,0)	
Ağır	11 (%50,0)	11 (%50,0)	
PASI skoru *	-	0,81±1,38	n/a
PASI skoru **	-	0,40 (0,20-0,80)	n/a
CRP * (mg)/L	13,81±16,08	10,03±17,02	0,303‡
CRP ** (mg)/L	6,55 (2,00-28,75)	3,00 (2,00-10,85)	0,303‡
WBC * (µl'de)	11000±16315,84	8453±2931,13	0,196‡
WBC ** (µl'de)	6650,0 (5567,5-8622,5)	7600,0 (5965,0-10292,5)	0,196‡
Nötrofil (%) *	59,27±8,2	59,28±11,02	0,807‡
Nötrofil (%) **	59,00 (52,50-64,00)	58,00 (51,25-65,75)	
RF * (U/ml)	366,17±741,58	-	n/a
RF ** (U/ml)	89,00 (47,75-113,50)	-	n/a
Negatif	7 (%31,8)	-	
Pozitif	12 (%54,6)	-	
Bilinmiyor	3 (%13,6)	-	
Anti-CCP Ab ** (IU/ml)	195,00 (81,00-214,25)	-	n/a
Negatif	6 (%27,3)	-	
Pozitif	13 (%59,1)	-	
Bilinmiyor	3 (%13,6)	-	

Tanımlayıcı istatistikler; * ortalama ± standart sapma ve ** medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) biçiminde gösterildi, † Student's t testi, ‡ Mann Whitney U testi, n/a: Değerlendirme yapılmadı.



Resim 4.1. Nötrofillerin metilen mavisi boyası ile boyanması

4.2. Çalışma Gruplarında NET Formasyon Düzeyleri

Gruplar arasında PMA ile uyarılmış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ($p < 0,001$) söz konusu farka neden olan durum; sağlıklı kontrol grubuna göre romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarındaki uyarılmış nötrofillerde NETozis düzeylerinin daha yüksek olmasıydı ($p < 0,001$ ve $p < 0,001$). Romatoid artrit ve psöriatik artrit grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,999$).

Gruplar arasında uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden de istatistiksel olarak anlamlı fark olup ($p < 0,001$) söz konusu farka neden olan durum; sağlıklı kontrol grubuna göre romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarındaki uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeylerinin daha yüksek olmasıydı ($p < 0,001$ ve $p < 0,001$). Romatoid artrit ve psöriatik artrit grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,999$).

Çizelge 4.3'te olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri farkları

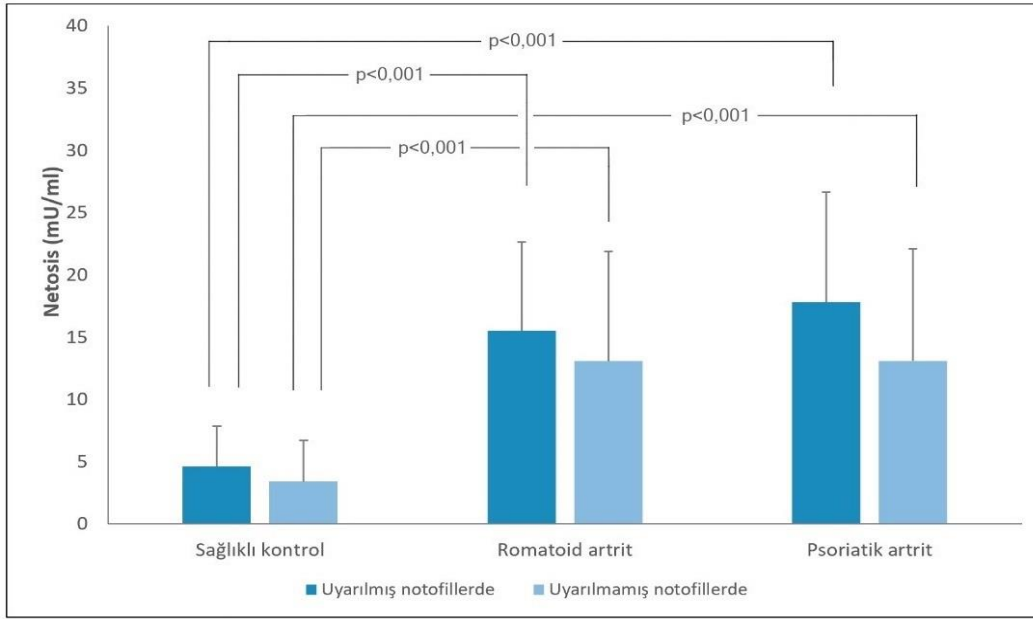
açısından yapılan karşılaştırmalar yer almaktadır.

Şekil 4.1 ve 4.2’de farklı grupların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinin NETozis düzeylerine ilişkin sırasıyla hata çubuklu bar grafik ve kutu çizgi grafik gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı gruplarda olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinin NETozis düzeyleri

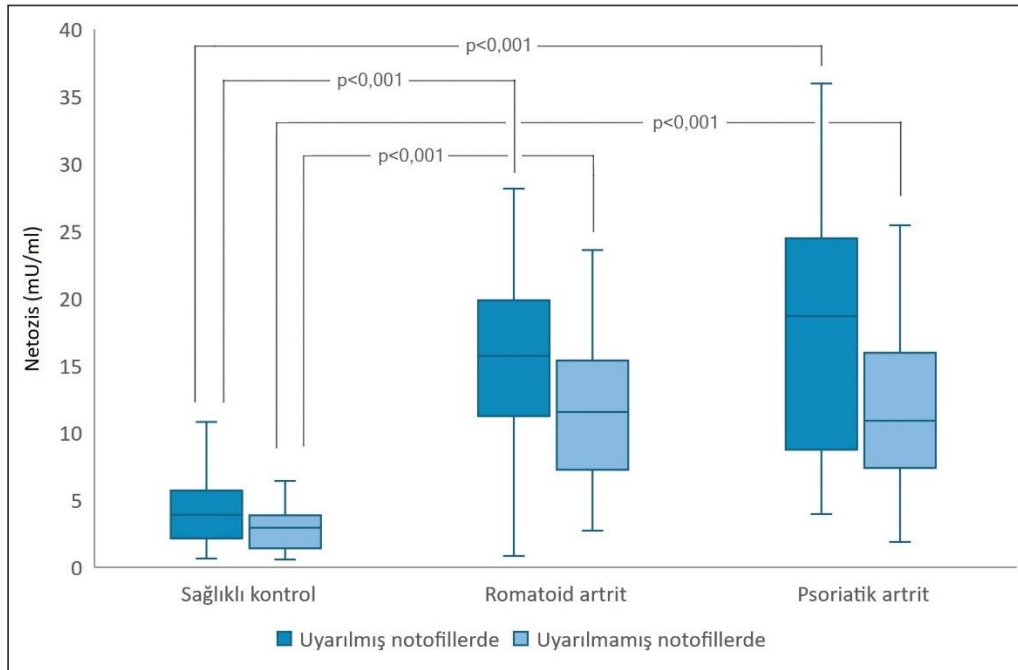
	Sağlıklı kontrol	Romatoid artrit	Psöriatik artrit	p-değeri †
Uyarılmış Nötrofiller *	4,59±3,26	15,48±7,15	17,80±8,84	<0,001
Uyarılmış Nötrofiller **	3,92 (2,14-5,73) ^{A,B,a}	15,72 (11,24-19,85) ^A	18,67 (8,73-24,47) ^B	<0,001
Uyarılmamış Nötrofiller *	3,38±3,32	13,04±8,82	13,07±8,99	<0,001
Uyarılmamış Nötrofiller **	2,94 (1,41-3,87) ^{A,B}	11,54 (7,24-15,39) ^A	10,88 (7,38-15,95) ^B	<0,001
PsA Serumı ile kültür edilmiş Nötrofiller *	1,31±1,19			n/a
PsA Serumı ile kültür edilmiş Nötrofiller **	0,82 (0,68-1,41) ^a	-	-	n/a
p-değeri ‡	<0,001¶	0,067¥	0,003¥	

Tanımlayıcı istatistikler; *ortalama ± standart sapma ve **medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) biçiminde gösterildi. † Uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, Kruskal Wallis testi, Bonferroni düzeltmesine göre $p<0,025$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ‡ Gruplar içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni düzeltmesine göre $p<0,0167$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ¶ Friedman testi, ¥ Wilcoxon işaret testi, n/a: Değerlendirme yapılmadı. ^A Sağlıklı kontrol grubu ile romatoid artrit grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), ^B Sağlıklı kontrol grubu ile Psöriatik artrit grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$). ^a Uyarılmış nötrofillerde NETozis düzeyleri ile serum NETozis arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$).



Her bir kutunun üst kenarı ortalama NETozis düzeylerini ifade ederken kutuların üst kenarlarından uzayıp devam eden çubuklar ise standart sapma değerine karşılık gelmektedir.

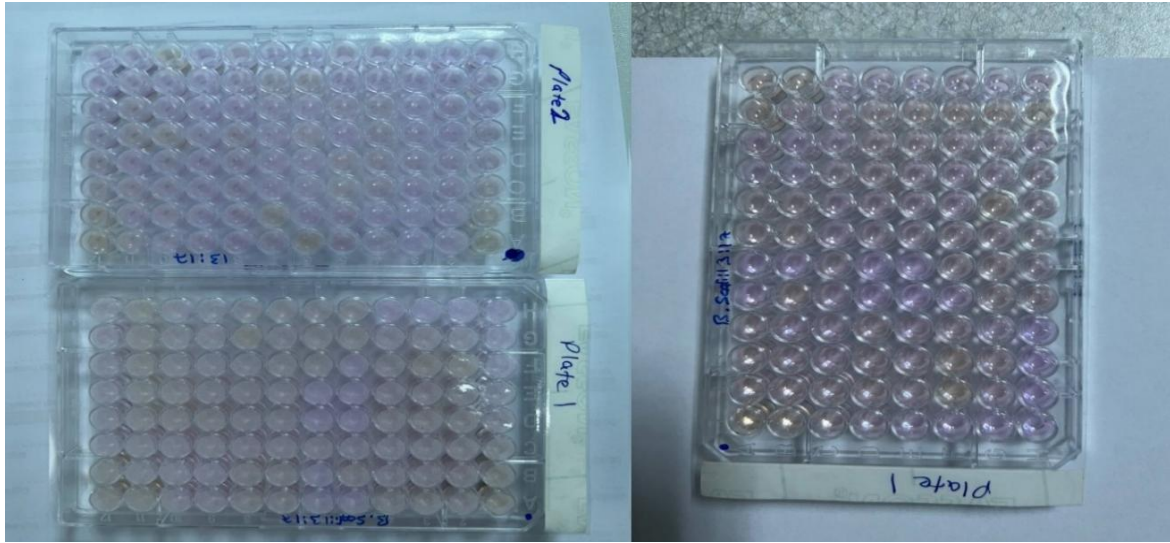
Şekil 4.1. Gruplara göre uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik



Her bir kutunun ortasında yer alan çizgiler medyan NETozis düzeylerini ifade ederken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; NETozis ölçümlerine ait 25.yüzdelik ve 75.yüzdelik değerlere karşılık gelmektedir. Kutuların alt ve üst kenarlarından uzayarak aşağıya ve yukarıya doğru devam eden dik kesitler ise sırasıyla; minimum ve maksimum değerleri temsil etmektedir.

Şekil 4.2. Sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarında olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeylerine ilişkin kutu-çizgi grafiği

NET formasyon ölçümünde kullanılan plaklar Resim 4.2’de gösterilmiştir.



Resim 4.2. Substrat eklendikten sonra çalışmada kullanılan mikropalaklar

4.3. Hasta Gruplarının NET Formasyon Düzeylerinin Hastalık Şiddetiyle Karşılaştırılması

Romatoid artrit tanısı alan grup içerisinde Hafif-Orta derecede hasta olanlarla ağır hasta olanlar arasında sırasıyla; uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri yönünden Bonferroni düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,401$ ve $p=0,016$).

Psöriatik artrit tanısı alan grup içerisinde de Hafif-Orta derecede hasta olanlarla ağır hasta olanlar arasında sırasıyla; uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri yönünden Bonferroni düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,898$ ve $p=0,606$).

Hafif-Orta derecede RA olanlar ile Hafif-Orta derecede PsA olanlar arasında sırasıyla; uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri yönünden Bonferroni düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,365$ ve $p=0,401$). Ağır derecede RA olanlar ile ağır derecede PsA olanlar arasında sırasıyla; uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri yönünden Bonferroni düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,847$ ve $p=0,699$).

Çizelge 4.4’te tanı ve hastalık şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış

nötrofillerinde NETozis düzeyleri sunulmuştur.

Çizelge 4.5’de hasta ve kontrol grupları arasında hastalık şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri farkları açısından yapılan karşılaştırmalar yer almaktadır.

Şekil 4.3.’te hastalık gruplarına ve şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri hata çubuklu bar grafik sunulmuştur.

Şekil 4.4’de RA ve PsA grupları içerisinde hastalık şiddetine göre uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Tanı ve hastalık şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri

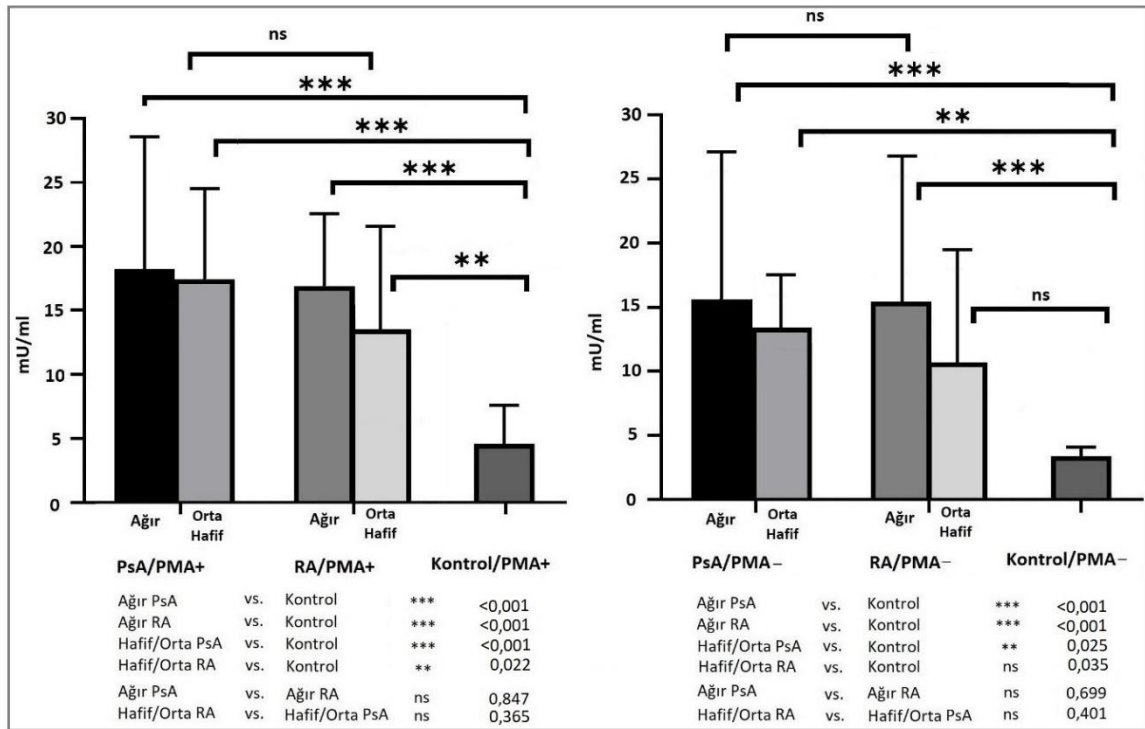
	Romatooid artrit	Psöriatik artrit	p-değeri †
Uyarılmış			
<i>Hafif-Orta</i>	* 14,08±8,29 ** 13,70 (7,07-21,26)	* 17,38±7,33 ** 19,83 (8,78-20,85)	0,365
<i>Ağır</i>	* 16,89±5,86 ** 16,80 (13,39-19,38)	* 18,21±10,49 ** 17,52 (5,76-26,56)	0,847
p-değeri ‡	0,401	0,898	
Uyarılmamış			
<i>Hafif-Orta</i>	* 10,44±9,04 ** 8,71 (5,84-11,57)	* 13,43±4,24 ** 11,06 (7,73-13,89)	0,401
<i>Ağır</i>	* 15,65±8,16 ** 14,51 (10,66-16,09)	* 15,70±11,69 ** 10,70 (5,36-25,43)	0,699
p-değeri ‡	0,016	0,606	

Tanımlayıcı istatistikler; *ortalama ± standart sapma ve ** medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) biçiminde gösterildi. † Hastalık şiddeti sabit tutulduğunda uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, Mann Whitney U testi, Bonferroni düzeltmesine göre p<0,0125 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ‡ Gruplar içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden hastalık şiddetine göre yapılan karşılaştırmalar, Mann Whitney U testi, Bonferroni düzeltmesine göre p<0,0125 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grupları arasında hastalık şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinde NETozis düzeyleri farkları açısından yapılan karşılaştırmalar

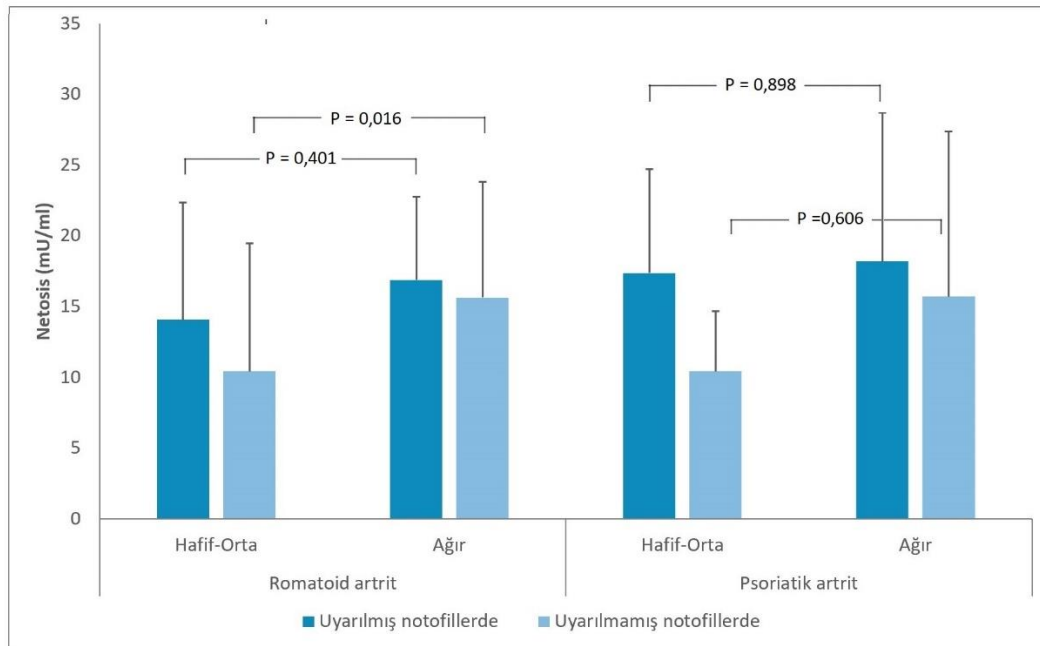
PMA+ RA <i>Hafif-Orta</i>	PMA+ Sağlıklı kontrol	p-değeri †
* 14,08±8,29	*4,59±3,26	0,022
** 13,70 (7,07-21,26)	**3,92 (2,14-5,73)	
PMA+ RA <i>Ağır</i>	PMA+ Sağlıklı kontrol	<0,001
* 16,89±5,86	*4,59±3,26	
** 16,80 (13,39-19,38)	**3,92 (2,14-5,73)	0,035
PMA- RA <i>Hafif-Orta</i>	PMA-Sağlıklı kontrol	
* 10,44±9,04	*3,38±3,32	<0,001
** 8,71 (5,84-11,57)	**2,94 (1,41-3,87)	
PMA-RA <i>Ağır</i>	PMA- Sağlıklı kontrol	<0,001
* 15,65±8,16	*3,38±3,32	
** 14,51 (10,66-16,09)	**2,94 (1,41-3,87)	<0,001
PMA+ PsA <i>Hafif-Orta</i>	PMA+ Sağlıklı kontrol	
* 17,38±7,33	*4,59±3,26	<0,001
** 19,83 (8,78-20,85)	**3,92 (2,14-5,73)	
PMA+ PsA <i>Ağır</i>	PMA+ Sağlıklı kontrol	<0,001
* 18,21±10,49	*4,59±3,26	
** 17,52 (5,76-26,56)	**3,92 (2,14-5,73)	0,025
PMA- PsA <i>Hafif-Orta</i>	PMA- Sağlıklı kontrol	
* 13,43±4,24	*3,38±3,32	<0,001
** 11,06 (7,73-13,89)	**2,94 (1,41-3,87)	
PMA- PsA <i>Ağır</i>	PMA- Sağlıklı kontrol	<0,001
* 15,70±11,69	*3,38±3,32	
** 10,70 (5,36-25,43)	**2,94 (1,41-3,87)	

Tanımlayıcı istatistikler; *ortalama ± standart sapma ve ** medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) biçiminde gösterildi. † Hastalık şiddeti sabit tutulduğunda uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri yönünden Hasta ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırmalar, Mann Whitney U testi, Bonferroni düzeltmesine göre p<0,025 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi



Her bir kutunun üst kenarı ortalama NETozis düzeylerini ifade ederken kutuların üst kenarlarından uzayıp devam eden çubuklar ise standart sapma değerine karşılık gelmektedir.

Şekil 4.3. Hasta ve kontrol grupları arasında hastalık şiddetine göre olguların uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerinin NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik



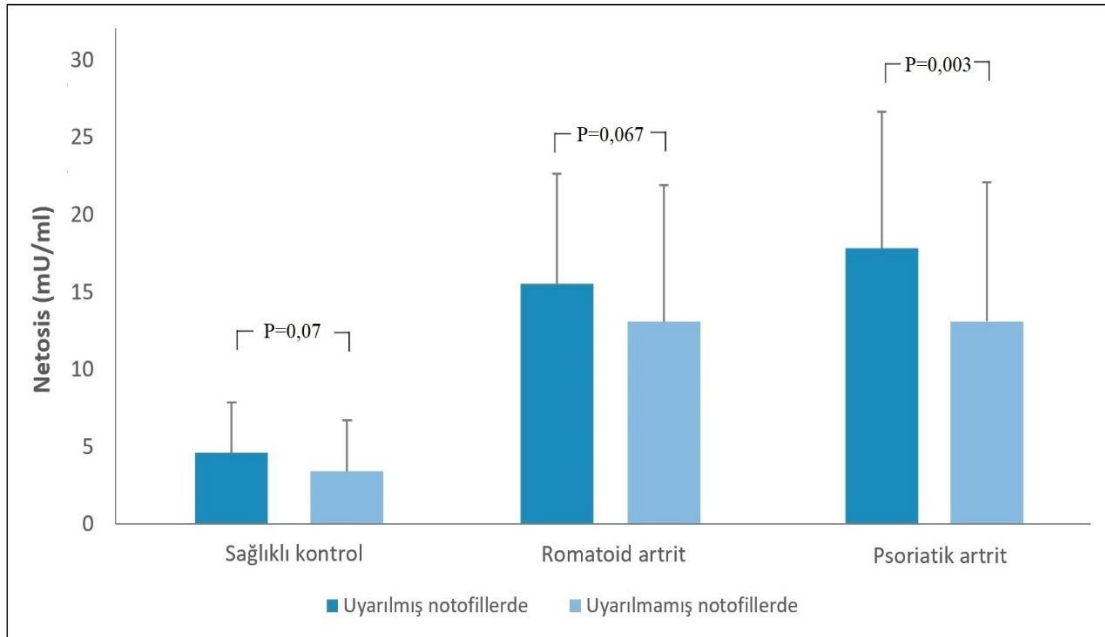
Her bir kutunun üst kenarı ortalama NETozis düzeylerini ifade ederken kutuların üst kenarlarından uzayıp devam eden çubuklar ise standart sapma değerine karşılık gelmektedir.

Şekil 4.4. RA ve PsA grupları içerisinde hastalık şiddetine göre uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik

4.4. Çalışma Gruplarında Uyarılmış ve Uyarılmamış Nötrofillerde NET Formasyon Düzeylerinin Karşılaştırması

Tüm olgular içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri farkı yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup ($p=0,034$), söz konusu farka neden olan durum; PsA grubunda RA ve sağlıklı kontrol grubuna göre uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri farkının daha fazla olmasıydı.

Romatoid artrit grubunda uyarılmış nötrofillerde NETozis düzeyleri uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeylerinden daha yüksek olmasına karşın söz konusu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,067$). Kontrol grubunda da uyarılmış nötrofillerde NETozis düzeyleri ile uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri arasında Bonferroni düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,07$). Psöriatik artrit grubunda ise PMA ile uyarılmış nötrofillerde NETozis düzeyleri uyarılmamış nötrofillerin NETozis düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti (Bkz. Çizelge 4.3) (Şekil 4.5) ($p=0,003$).



Her bir kutunun üst kenarı ortalama NETozis düzeylerini ifade ederken kutuların üst kenarlarından uzayıp devam eden çubuklar ise standart sapma değerine karşılık gelmektedir.

Şekil 4.5. Tüm olgular içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri farkına ilişkin hata çubuklu bar grafik

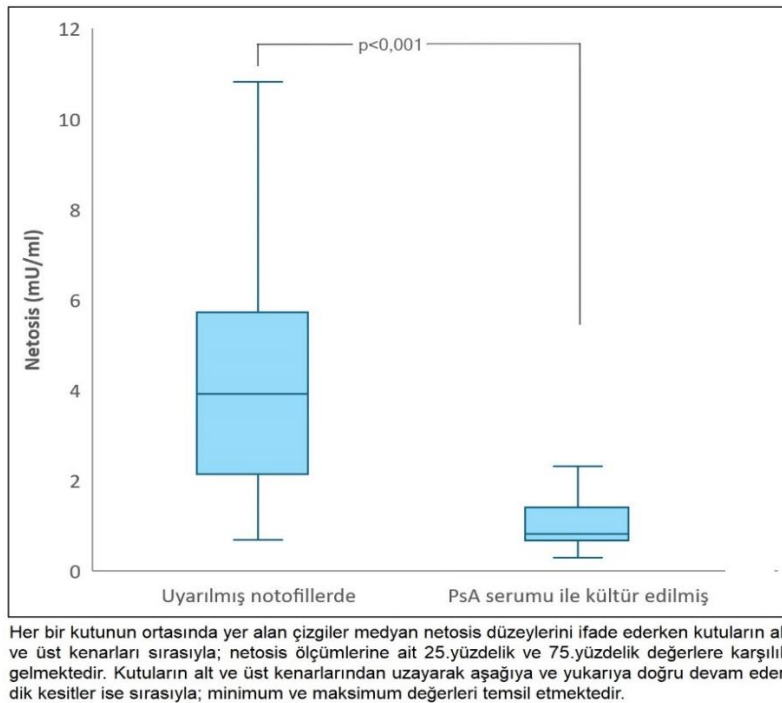
4.5. Kontrol Grubu Nötrofillerinde PsA Serumu ile NET Degradasyon Düzeyleri

Sağlıklı kontrol grubu tarafından salınan NET'lerin, PsA'lı hastaların serumu ile 6 saat inkübasyondan sonra medyan degradasyon yüzdesi 75,2 (25.yüzdelik=56,6 ve 75.yüzdelik=85,6) olarak saptandı.

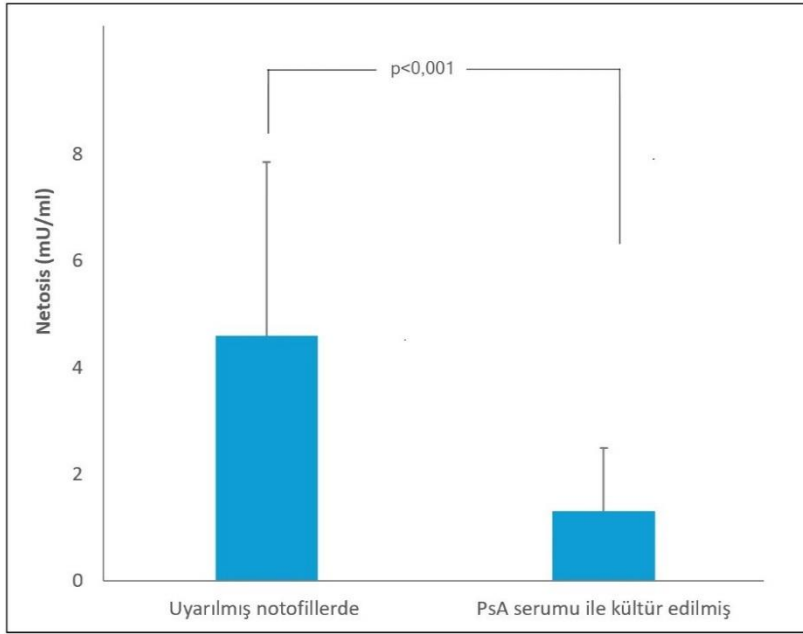
Sağlıklı kontrol grubu içerisinde NETozis düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş olup ($p<0,001$) söz konusu farka neden olan durum; PMA ile uyarılmış nötrofillerde NETozis düzeylerinin PsA serumu ile kültür edilmiş nötrofillerin NETozis düzeylerinden daha yüksek olmasıydı ($p<0,001$).

Şekil 4.6 ve 4.7'de sağlıklı kontrol grubu içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerin NETozis düzeyleri ile PsA serumu ile kültür edilmiş nötrofillerin NETozis düzeylerine ait kutu çizgi grafik ve hata çubuklu bar grafik yer almaktadır.

Şekil 4.8'de sağlıklı kontrol grubunun tarafından salınan NET'lerin, PsA serumu ile medyan degradasyon yüzdesi sunulmuştur.

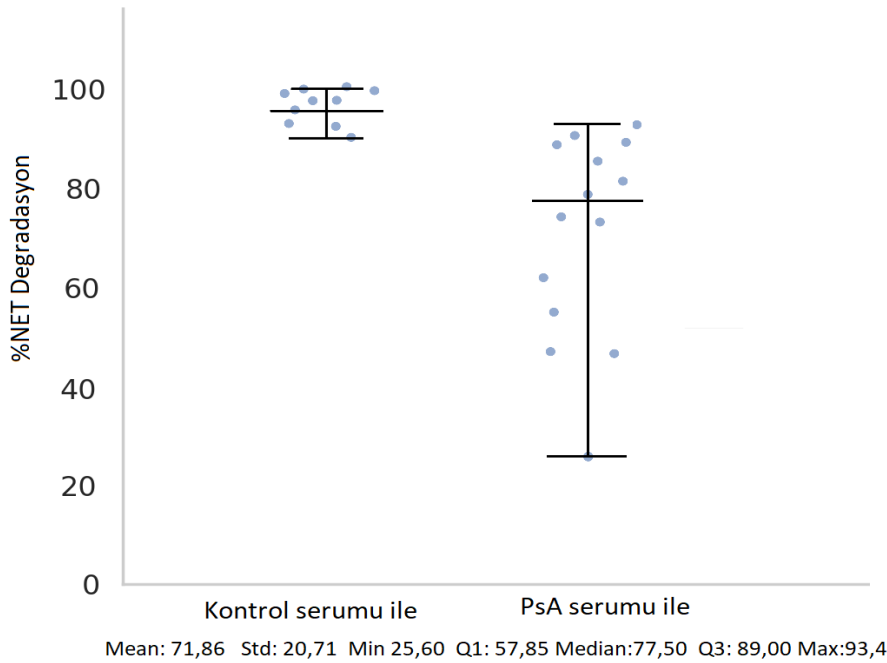


Şekil 4.6. Sağlıklı kontrol grubu içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerin ve PsA serumu ile degrade olmuş NET'lerin NETozis düzeylerine ilişkin kutu-çizgi grafik



Her bir kutunun üst kenarı ortalama netosis düzeylerini ifade ederken kutuların üst kenarlarından uzayıp devam eden çubuklar ise standart sapma değerine karşılık gelmektedir.

Şekil 4.7. Sağlıklı kontrol grubu içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri ile PsA serumu ile degrade olmuş NET'lerin NETozis düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik



Şekil 4.8. PsA serumlarının kontrol nötrofillerinde NET degradasyonu üzerine etkileri

4.6. Çalışma Gruplarının Serum LL-37 Düzeyleri

Gruplar arasında serum LL-37 düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olup ($p<0,001$) söz konusu farka neden olan durum; RA ve sağlıklı kontrol gruplarına göre PsA grubunun serum LL-37 düzeyinin daha yüksek olmasıydı ($p<0,001$ ve $p<0,001$). ($p<0,001$). Sağlıklı kontrol ile RA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,999$).

Çizelge 4.6’da farklı gruplarda olguların serum LL-37 düzeyleri açısından yapılan karşılaştırmalara ait detaylar verilmiştir.

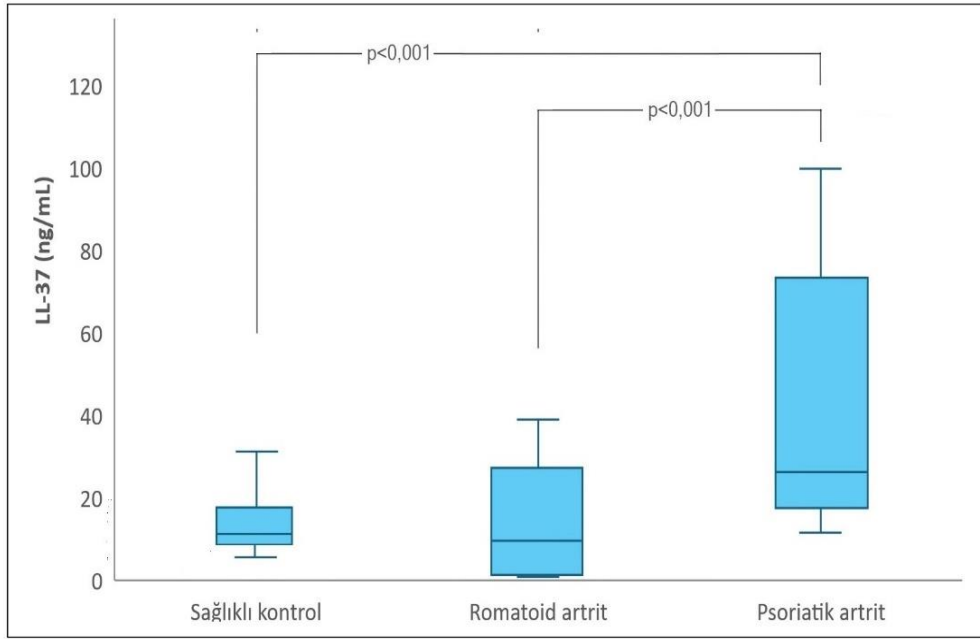
Şekil 4.9’da sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarında olguların serum LL-37 ölçümlerine ilişkin kutu-çizgi grafiği sunulmuştur.

Şekil 4.10’da sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarında olguların serum LL-37 ölçümlerine ilişkin hata çubuklu bar grafiği sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Farklı gruplarda olguların serum LL-37 düzeyleri

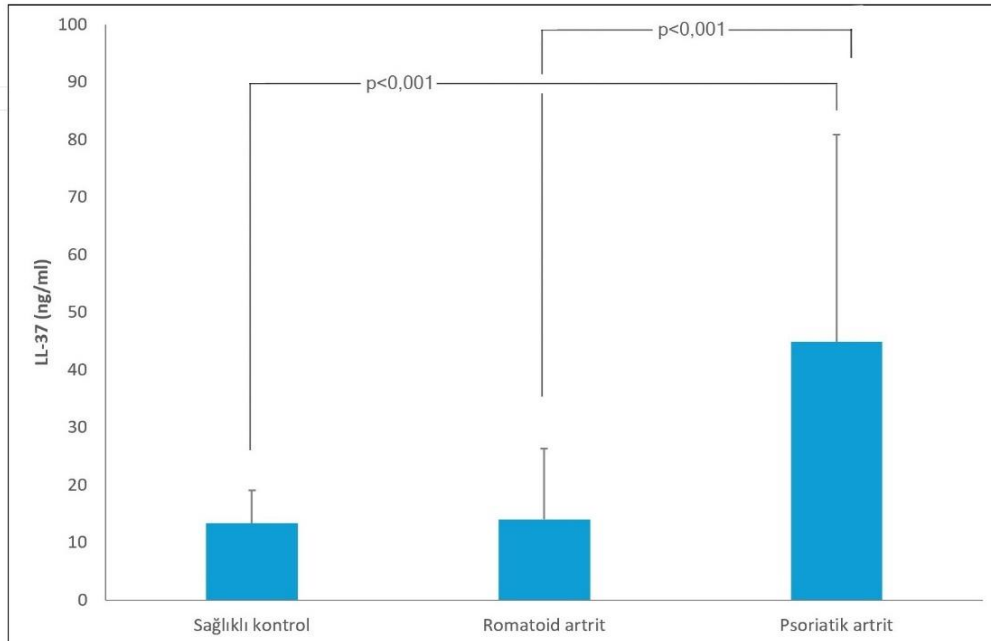
	LL-37 (ng/mL) *	LL-37 (ng/mL) **
Sağlıklı kontrol	13,40±5,72	11,85 (9,14-18,63) ^A
Romatoid artrit	14,06±12,27	9,58 (1,38-27,25) ^A
Psöriatik artrit	44,88±36,02	26,24 (17,53-73,43) ^A
p-değeri †	<0,001	<0,001

Tanımlayıcı istatistikler; *ortalama ± standart sapma ve **medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) biçiminde gösterildi. † Kruskal Wallis testi. ^A Romatoid artrit ve kontrol grupları ile psöriatik artrit grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$).



Her bir kutunun ortasında yer alan çizgiler medyan LL-37 düzeylerini ifade ederken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; LL-37 ölçümlerine ait 25.yüzdelik ve 75.yüzdelik değerlere karşılık gelmektedir. Kutuların alt ve üst kenarlarından uzayarak aşağıya ve yukarıya doğru devam eden dik kesitler ise sırasıyla; minimum ve maksimum değerleri temsil etmektedir.

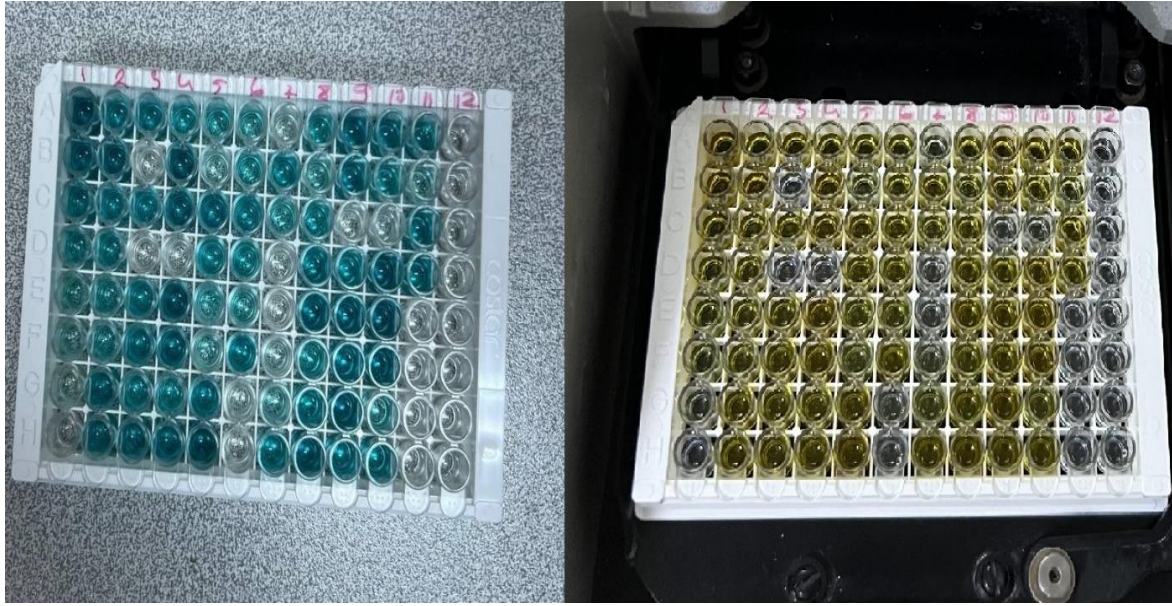
Şekil 4.9. Sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarında olguların serum LL-37 ölçümlerine ilişkin kutu-çizgi grafik



Her bir kutunun üst kenarı ortalama LL-37 düzeylerini ifade ederken kutuların üst kenarlarından uzayıp devam eden çubuklar ise standart sapma değerine karşılık gelmektedir.

Şekil 4.10. Sağlıklı kontrol, romatoid artrit ve psöriatik artrit gruplarına göre LL-37 ölçümlerine ilişkin hata çubuklu bar grafik

Serum LL-37 ölçümünde kullanılan plaklar Resim 4.3'te gösterilmiştir.



Resim 4.3. Durdurma solüsyonunu ile örneklerin renginin maviden sarıya dönmesi

Romatoid artrit tanısı alan grup içerisinde hafif-orta derecede hasta olanlarla ağır hasta olanlar arasında serum LL-37 düzeyleri istatistiksel olarak benzerdi ($p>0,999$).

Psöriatik artrit tanısı alan grup içerisinde de hafif-orta derecede hasta olanlarla ağır hasta olanlar LL-37 düzeyleri açısından istatistiksel olarak benzerdi ($p=0,604$).

Hafif-orta derecede RA'lı olanlara göre hafif-orta derecede PsA'lı olan hastaların serum LL-37 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti ($p=0,016$).

Ağır derecede RA'lı olanlara göre ağır derecede PsA'lı olan hastaların serum LL-37 düzeyleri de istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti ($p=0,024$).

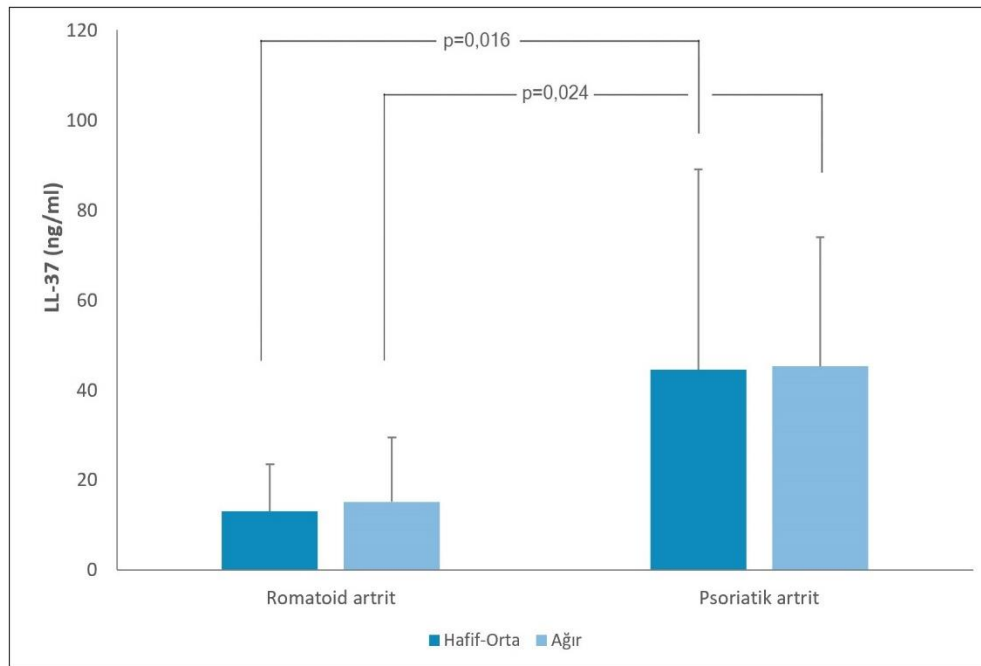
Çizelge 4.7'de hastalık gruplarına ve şiddetine göre olguların serum LL-37 düzeyleri açısından karşılaştırması gösterilmiştir.

Şekil 4.11'de romatoid artrit ve psöriatik artrit grupları içerisinde hastalık şiddetine göre LL-37 düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Tanı ve hastalık şiddetine göre olguların serum LL-37 düzeyleri

	Romatoid artrit	Psöriatik artrit	p-değeri †¶
Hafif-Orta *	13,01±10,42	44,46±44,59	0,016
Hafif-Orta **	10,10 (4,61-24,26)	26,24 (14,37-68,09)	0,016
Ağır *	15,11±14,32	45,26±28,75	0,024
Ağır **	9,07 (1,15-29,83)	28,48 (23,14-76,08)	0,024
p-değeri ‡¶	>0,999	0,604	

Tanımlayıcı istatistikler; *ortalama ± standart sapma ve **medyan (25.yüzdelik-75.yüzdelik) biçiminde gösterildi. † Hastalık şiddeti sabit tutulduğunda gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar, ‡ Gruplar içerisinde hastalık şiddetine göre yapılan karşılaştırmalar, ¶ Mann Whitney U testi, Bonferroni düzeltmesine göre $p<0,025$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Her bir kutunun üst kenarı ortalama LL-37 düzeylerini ifade ederken kutuların üst kenarlarından uzayıp devam eden çubuklar ise standart sapma değerine karşılık gelmektedir.

Şekil 4.11. Romatoid artrit ve psöriatik artrit grupları içerisinde hastalık şiddetine göre LL-37 düzeylerine ilişkin hata çubuklu bar grafik.

Kontrol grubu içerisinde serum LL-37 düzeyi ölçümleri ile sırasıyla; uyarılmış nötrofillerde, uyarılmamış nötrofillerde ve PsA serumu ile kültür edilmiş nötrofillerde, NETozis farkı

arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir korelasyon tespit edilmedi ($p>0,05$).

Romatoid artrit grubu içerisinde serum LL-37 düzeyi ölçümleri ile sırasıyla; uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri arasında Bonferroni düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir korelasyon tespit edilmedi ($p>0,0083$).

Ayrıca, serum LL-37 düzeyi ölçümleri ile uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri farkı arasında da istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir korelasyon tespit edilmedi ($r=-0,387$ ve $p=0,075$).

Psöriatik artrit grubu içerisinde de serum LL-37 düzeyi ölçümleri ile sırasıyla; uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis farkı arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir korelasyon tespit edilmedi ($p>0,05$).

Çizelge 4.8’de farklı gruplar içerisinde NETozis düzeyleri ile serum LL-37 düzeyi ölçümleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri verilmiştir.

Çizelge 4.9’da Tüm olgular içerisinde NETozis düzeyleri ile serum LL-37 düzeyi ölçümleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri verilmiştir.

Çizelge 4.8. Gruplar içerisinde NETozis düzeyleri ile serum LL-37 düzeyi ölçümleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri

	Sağlıklı kontrol	Romatoid artrit	Psöriatik artrit
Uyarılmış			
Korelasyon katsayısı	-0,274	-0,511	0,140
p-değeri †‡	0,243	0,015	0,567
Uyarılmamış			
Korelasyon katsayısı	0,268	-0,198	-0,033
p-değeri †‡	0,254	0,376	0,892
Serum			
Korelasyon katsayısı	0,161	n/a	n/a
p-değeri †	0,498	n/a	n/a
Uyarılmış-Uyarılmamış farkı			
Korelasyon katsayısı	-0,260	-0,387	0,181
p-değeri †¶	0,268	0,075	0,459

† Spearman’ın sıra sayıları korelasyon testi, ‡ Bonferroni düzeltmesine göre $p<0,0083$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, ¶ Bonferroni düzeltmesine göre $p<0,0167$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. n/a: Değerlendirme yapılmadı.

Çizelge 4.9. Tüm olgular içerisinde NETozis düzeyleri ile serum LL-37 düzeyi ölçümleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önemlilik düzeyleri

	Korelasyon katsayısı	p-değeri †
Uyarılmış	-0,152	0,243
Uyarılmamış	-0,091	0,483
Uyarılmış-Uyarılmamış farkı	-0,139	0,285

† Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testi.

5. TARTIŞMA

Psöriatik artrit, eklem hasarı ve deri bulgularıyla seyreden, psöriazis ile ilişkili, heterojen klinik özelliklere sahip enflamatuvar bir hastalıktır. Vakaların çoğunda, plakların gelişimi artrit başlangıcından yıllar önce gerçekleşir, ancak hastaların az bir kısmında psöriazis gelişmeden önce eklem tutulumu başlayabilir. PsA'da, eklemdede ağrı, şişlik, ısı artışı, hassasiyet ve genellikle asimetrik olan ve 30 dakikadan fazla süren sabah tutukluğu görülmektedir. Psöriatik artrit artık sadece cilt ve eklemi tutan bir hastalık değil, aynı zamanda metabolik sendrom, diyabet, hiperlipidemi, karaciğer hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili morbidite ve mortaliteye neden olabilen kronik sistemik enflamatuvar bir hastalık olarak kabul edilmektedir [20, 218].

Contessa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, PsA'lı hastalarda subklinik ateroskleroz gelişme riskinin arttığını göstermiştir [334]. Başka bir çalışmada PsA'lı grupta, kontrol grubuna göre karotis intima-media kalınlığının anlamlı olarak arttığı ve bu artışın hastalığın süresi ve şiddetiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [335]. PsA'lı hastalarda metabolik sendrom prevalansının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu hastalarda adipositokin seviyelerinin de yükseldiği tespit edilmiştir [336].

Bu sonuçlar, PsA'lı hastaların sadece eklem ve cilt sorunları ile değil, aynı zamanda metabolik ve kardiyovasküler risklerle de karşı karşıya olduğunu göstermektedir. Birçok farklı klinik bulgu ve belirti ile görülen, relaps ve remisyonlarla seyreden ve yaşam kalitesini şiddetli sistemik hastalıklar kadar etkileyebilen PsA, hastaların çoğunun aralıksız sistemik tedavi altında olması gerektirebilir.

PsA'nın immünopatolojisinin daha iyi anlaşılması, ileride kişiye özel ve daha az yan etkiye sahip tedavilerin planlanmasına katkıda bulunabilir. Bu, gereksiz, aşırı yıpratıcı ve yüksek maliyetli tedavi denemelerinin önüne geçebilir, hastaların yaşam kalitesini artırabilir ve sağlık hizmetlerinin kullanımını daha verimli hale getirebilir. Nötrofiller sıklıkla hasta insanlarda ve hayvan hastalık modellerinde doku enflamasyon bölgelerinde bulunur; solunum patlaması ve ROS üretimi otoimmün hastalık için önemli risk faktörleridir [143]. Birçok otoimmün durumda, nötrofiller, SLE ve RA gibi hastalıklarda gösterildiği üzere NET'leri serbest bırakır. Lupus komplikasyonlarının, anti-NET otoantikörlerinin titreleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.

Düzensiz NET oluşumu, çeşitli NET bileşenlerine karşı otoantikorlar üretilmesine neden olarak otoimmüniteyi de uyarabilir [145]. MPO ve PR3 gibi NETozis belirteçlerine karşı antinükleer antikorların, kronik otoimmün hastalarda ve hayvan modellerinde sıklıkla gözlemlendiği bilinmektedir. Ayrıca, aktif otoimmün hastalığı olan bireylerde dolaşımdaki NET seviyeleri de artmıştır [152]. RA'da NET'ler, sitrülünlenmiş otoantijenlerin kaynağıdır; MPO, NE ve katepsin G gibi nötrofil granüler proteinler, muhtemelen aşırı NETozis nedeniyle sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunur ve eklem hasarına katkıda bulunabilir. Sitrülünlenmiş vimentine karşı otoantikorlar RA'lı hastalarda osteoklastogenezi ve kemik erozyonunu indükler; NET'lerde bulunan sitrülünlenmiş proteinlere karşı üretilen otoantikorlar NETozis'i tetikleyerek enflamatuvar süreçlerinin sürdürülmesinde rol oynar [204].

Bu bulgular, NETozis'in otoimmün yanıtı tetikleyen muazzam bir otoantikor havuzu üretilmesine neden olduğunu açıkça göstermektedir. Sitrülünlenmiş proteinler (örneğin, histon H3, histon H4 ve vimentin) içeren NET'ler, FLS tarafından TLR9'a bağımlı bir şekilde alınır ve bu hücrelerde MHC sınıf II ekspresyonunun artırarak NET peptidlerinin CD4⁺ T hücrelerine sunulmasına yol açar [215]. NET veya LL-37 ve histonlar gibi NET bileşenlerine maruz kalan makrofajlarda aktif kaspaz-1 üretilir, bu da aktif İL-1 β ve İL-18'in üretilmesine yol açar. pDC ise NET bileşenleriyle aktive edildiğinde İFN- α eksprese eder [216, 217]. Dolayısıyla NET, hem bir otoantijen kaynağını temsil eder hem de çeşitli hücre tiplerini etkileyerek ve sitokinlerin salınımına neden olarak da enflamasyonda rol alır.

Mevcut model, hayvan modelleri ve insan dokularından elde edilen verilere dayanarak, stres altındaki keratinositlerin salgıladığı DNA'nın antibakteriyel peptid LL-37 ile etkileşime girmesiyle teşvik edildiğini göstermektedir. DNA+LL-37 kompleksi, pDC hücreler üzerinde bulunan TLR-9'a bağlanır ve İFN- α salınımını tetikler; İFN- α da miyeloid dendritik hücrelerin uyarılmasını sağlar. Miyeloid dendritik hücrelerin İFN- α tarafından aktivasyonu, bu hücrelerin lenf düğümüne göç etmesini sağlar. Lenf düğümünde DC'ler, naif T hücrelerinin Th1 ve Th17 hücrelerine farklılaşmasına neden olarak TNF, İL-22, İL-17 sitokinlerinin salınmasına yol açar. İL-17A ve TNF- α birlikte OSCAR ve RANKL'ın ifadesini indükleyerek monositlerin osteoklasta farklılaşmasına dolayısıyla osteoklastogeneze ve kemik rezorpsiyona neden olabilir. [263, 293-298]. Bu sitokinler, psöriatik tırnak hastalığı ile eklem hasarını birbirine bağlayan kritik bir sitokin olabilir. Bu PsA patogenezi ile ilişkili yeni bir hipotezin temel özelliğidir. Ek olarak, yakın zamanda

yapılan iki çalışma, psöriatik NET'lerin LL-37 içerebileceğini öne sürmüştür [294, 337].

Bu nedenle, PsA'lı hastalarda NETozis'in, plazmasitoid dendritik hücreleri İFN- α üretmek üzere aktive edebilen, hastalığının başlamasına ve alevlenmesine yol açabilen LL-37-DNA komplekslerinin salgılanmasına neden olması mümkündür. NETozis sonucunda DNA'nın salınması ve NET bileşenlerinde LL-37'nin bulunması PsA'da dikkate alınması gereken bir mekanizma olabileceğini düşünerek, burada sunulan tez çalışmamızda PsA'lı hastalarda NET formasyonunu ve LL-37 düzeylerini inceledik.

Romatoid artrit, psöriatik artrit ve sağlıklı kontrol grupları arasında PMA ile uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Bu farkın nedeni, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla PsA ve RA gruplarındaki uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NET formasyonunun daha yüksek olmasıydı. Ancak, PsA ve RA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p>0,999$). Psöriazis ve PsA'da NET oluşumunu tetikleyen uyaranlar şu anda bilinmemektedir. PsA'lı hastalarda, İL-9, İL-17A/F, İL-22, İL-23, İFN- γ ve TNF- α sitokinlerin serum seviyelerinin yükseldiğini gösterilmiştir [248, 262, 270, 286, 338]. İnterferonlar, İL-1 β , TNF- α ve İL-17 gibi bu sitokinlerden bazılarının, PsA dışındaki hastalıklarda NET oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir [70, 339-341]. PsA serumunda NETozis'in tetiklenmesinden sorumlu olabilecek spesifik faktörlerin belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

NETozis'in PsA patogenezindeki rolü daha tanımlanmamıştır. İL-17A, psöriazis ve PsA patogenezinde önemli bir rol oynayan proenflamatuvar bir sitokindir. Psöriazis deri lezyonlarında, İL-17'nin Th17 hücreleri tarafından üretildiğine dair önceki inanın aksine, İL-17'nin çoğunluğunun mast hücreleri ve nötrofiller tarafından üretildiği gösterilmiştir [247]. Nötrofillerin ve mast hücrelerinin psöriazis deri lezyonlarında NET oluşumu yoluyla İL-17'yi serbest bıraktığı gösterilmiştir. Nötrofillerden salınan İL-17A, keratinositleri CCL20'yi eksprese etmek için uyarır. Bu kemokin Th17 hücrelerini enflamasyonlu bölgeye çeker ve sonunda pozitif bir geribildirim döngüsü oluşturarak psöriatik lezyonların gelişimine katkıda bulunur [301, 302]. PsA'lı hastaların nötrofillerinde NETozis artışı olduğu bilindiğine göre, bu nötrofillerin PsA'lı hastalarda NETozis yoluyla İL-17 üretilip üretilmediğini belirlemek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Hem Th1 hem de Th17 yanıtlarının RA patogenezinde katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir.

NET'lerin *in vitro* İFN- γ üreten Th1 hücrelerinin indüksiyonunu desteklediğini gösterilmiştir. Kolajen ile indüklenen artrit (CIA) fare modelinde PAD4 enzimin inhibisyonu, NET oluşumunu önemli ölçüde azaltır, klinik hastalık aktivitesini hafifletir ve eklem hasarını önler. Buna ek olarak, PAD4 inhibisyonu, farelerin lenf düğümlerinde Th1 hücrelerinin sıklığını önemli ölçüde azaltır. Dendritik hücrelerin CIA'dan türetilmiş NET'lere maruz bırakılması, kostimülatör moleküller olan CD80 ve CD86'nın ekspresyonunu ve ayrıca İL-6'nın yüksek salgılanmasıyla karakterize edilen DC olgunlaşmasını indükler. RA'lı hastalardan alınan NET'ler, sağlıklı bireylerden alınan DC'lerin olgunlaşmasını teşvik etme potansiyelini artırmaktadır [342].

İnsan nötrofilleri tarafından salınan NET'ler, T hücrelerinde CD25 ve CD69 ekspresyonunu ve ZAP70'in fosforilasyonunu artırarak bu hücrelerde aktivasyon eşiğini doğrudan azaltır. Bu süreç T hücrelerin anti-CD3 antikoruna veya spesifik antijenin yokluğunda dinlenme fazındaki DC'ler gibi optimal olmayan uyaranlara etkinleştirilebilir [303]. NET'lerin bu rolleri psöriazis ve psöriatik artrit patofizyolojisinde NETozis'in rolünü açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırma gerektiğine işaret etmektedir.

NETozis miktarının hastalığın şiddeti ile korelasyon gösterip göstermediğini değerlendirebilmek için, RA'lı hastaları hafif ve şiddetli gruplara ayırmak amacıyla DAPSA (Disease Activity in Psoriatic Arthritis) skoru, PsA'lı hastaları sınıflandırmak için ise DAS28 (Disease Activity Score-28) skoru kullanıldı. Bu skorlama sistemleri, hastalığın aktivitesinin objektif olarak değerlendirilmesine ve NETozis ile hastalık şiddeti arasındaki ilişkinin daha doğru bir şekilde analiz edilmesine olanak sağladı.

Psöriatik artrit ve romatoid artrit tanısı alan gruplar içerisinde ağır hasta olanların, hafif-orta derecede hasta olanlara göre NETozis düzeylerinin daha yüksek olmasına rağmen Bonferroni düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Geçmişte yapılan çalışmalarda ACPA pozitif RA'lı hastalarda MPO-DNA ve NE-DNA gibi NET bileşenlerinin seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur. ACPA, NET'lerin oluşumunu artırarak enflamasyonu teşvik eder ve bu durum, MPO-DNA ve NE-DNA'nın seviyelerinin artmasına neden olur [343]. Çalışmamızda nötrofiller periferik venöz kandan izole edildi ve ortamda herhangi bir antikor olmaksızın NET formasyonu incelendi. Ancak NET formasyonunun ağır RA'lı hastalarda hafif-orta şiddetteki RA'lı hastalara göre daha yüksek olduğu gözlenmiş olmasına rağmen, bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

saptanmadı.

Bir araştırmada PASI (Psoriasis Area and Severity Index) skoruna göre psöriazis şiddeti ile NETozis yapmış (NETotic) nötrofiller arasında pozitif korelasyon olduğu ve farklı hastalık şiddeti derecelerine sahip hastaların periferik kanındaki NETotik hücrelerin ortalama yüzdesinin arttığı gösterilmiştir [16]. Ancak bizim araştırmamızda, hastaların PASI puanı 10'un altında olduğu için, hastaları bu puana göre sınıflandırmak mümkün olmadı.

Tüm olgular içerisinde uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri farkı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Bu farka neden olan durum, PsA grubunda PMA ile uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri farkının RA ve sağlıklı kontrol grubuna göre daha fazla olmasıydı. RA'lı hastalar ve sağlıklı kontrollerde benzer bir artış görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuçlar, PsA'lı hastalarda nötrofillerin PMA ile uyarıldığında daha fazla NET ürettiğini ve bu durumun RA'lı hastalar ve sağlıklı bireylere kıyasla daha belirgin olduğunu göstermektedir.

PsA'lı hastalardan izole edilen nötrofillerin, PMA ile uyarıldığında NETozis gerçekleştirmeye daha hassas olmalarının nedeni, farklı enflamatuvar mediatörler, değişmiş nötrofil fenotipi, genetik ve epigenetik etkiler ve artmış oksidatif stres gibi faktörlerin kombinasyonu olabilir. Bu unsurlar, PsA'lı hastaların nötrofillerinin RA'lı hastalar ve sağlıklı bireylerdekinden daha fazla NETozis yapmaya hazır hale gelmesine yol açar. İlginç bir şekilde, SLE hastalarının çoğu, periferik kan mononükleer hücre fraksiyonundan ayrılan bir alt küme olan nötrofil benzeri hücreler olan düşük dansiteli granülositler (LDG'ler) sunar. Bu hücrelerin oluşumu SLE hastalarında cilt tutulumu ve vaskülit ile ilişkilidir. LDG'ler yüksek miktarlarda İL-6, İL-8, TNF ve tip I interferonlar üretir ve endotele zarar veren NET'ler oluşturur [13, 45, 344]. Bu bulgular LDG'lerin SLE patogenezinde önemli katkıda bulunma olasılığı olduğunu göstermektedir. PsA'lı hastaların nötrofilleri, RA veya sağlıklı kontrol grubunun nötrofillerinden farklı bir fenotip sergileyebilir. Bu değiştirilmiş fenotip, PMA'ya karşı daha duyarlı olabilir ve NETozis eğilimini artırabilir. Henüz PsA'lı hastaların nötrofil alt tipleri üzerine yapılan araştırmalar sınırlı sayıda olup daha fazla çalışmaya gerek vardır.

PsA, İL-17, İL-23 ve TNF- α gibi belirli enflamatuvar sitokinlerin yüksek seviyeleri ile ilişkilidir. Bu sitokinler, nötrofilleri uyarak PMA gibi uyarıcılara yanıtlarını artırabilir.

PsA'daki spesifik sitokin ortamı, nötrofilleri RA veya sağlıklı bireylerde olduğundan daha etkili bir şekilde NETozis yapmaya duyarlı hale getirebilir. PsA, hem cilt hem de eklemleri etkileyerek RA'dan farklı bir kronik enflamatuvar duruma neden olur. PsA'daki cilt tutulumu, nötrofilleri ek enflamatuvar sinyallere ve stresörlere maruz bırakabilir, bu da onların NETozis'e daha yatkın hale gelmesine neden olabilir. PsA'ya özgü genetik yatkınlıklar, nötrofil fonksiyonunu RA'dakinden farklı şekilde etkileyebilir. PsA hastalık ortamından etkilenen epigenetik değişiklikler de nötrofillerdeki gen ekspresyonu modellerini değiştirebilir ve PMA simülasyonuna karşı daha duyarlı hale getirebilir.

NET'ler serum yokluğunda 90 saatten fazla *in vitro* olarak stabildir, ancak mikrokokal nükleaz (MNaz) gibi nükleazlarla deneysel olarak degrade edilebilir. Bununla birlikte, NET'ler sağlıklı donörlerden alınan serumla (%10'luk konsantrasyonda) inkübasyonun ardından bozulmaktadır. NET degradasyon testinde, sağlıklı gönüllülerden alınan serumlar, 6 saat sonra ortalama %98,1'lik bir degradasyon yüzdesiyle NET'leri etkili bir şekilde parçalamaktadır. Psöriazisli ve RA'lı hastalardan alınan serumlar, sağlıklı gönüllülerden alınan serumlarla karşılaştırıldığında benzer NET degradasyon yeteneği göstermektedir. Dolayısıyla RA ve psöriazis hastalarında NET degradasyonu bozulmamıştır. Pankreasta üretilen ve sindirim sistemi ile kan dolaşımına salgılanan hücre dışı, endonükleaz olan DNase1, NET'leri parçalamaktan sorumludur. Lupus nefritli ve SLE'li hastaların serumları, DNase1'in inhibe edilmesi veya NET'lerin antikorlarla kaplanması ve nükleaz sindiriminden korunması nedeniyle NET'leri verimli şekilde parçalayamaz. SLE'li hastaların bir alt grubu altı saat sonra NET'lerin %63,9'unu ve başka bir alt grubun %36,1'ini degrade edebilmiştir. SLE hastalarının serumları, NET'lere bağlanan ve dolayısıyla onları DNase1'den koruyan yüksek antikor titrelerine sahiptir. DNase1'deki mutasyonlar ve polimorfizmler de SLE ile ilişkilendirilmiştir [16, 158].

Çalışmamızda sağlıklı kontrol grubu tarafından salınan NET'lerin, PsA'lı hastaların serumu ile 6 saat inkübasyonun ardından medyan degradasyon yüzdesi 75,2 (25.yüzdelik=56,6 ve 75.yüzdelik=85,6) olarak saptandı.

PsA'lı hastalarda NETozis'in rolüne odaklanan tek bir çalışma mevcuttur, bu çalışmada, MPO-DNA kompleksleri hastaların serumunda ELISA yöntemi ile tespit edilmiş ve MPO-DNA kompleksinin PsA'lı hastaların serumunda yükseldiğini ortaya konmuştur. PsA serumunda nükleazlar tarafından NET degradasyonunun azalması NET bileşenlerin daha fazla serumda kalmasına neden olur ve bu çalışmadan çıkan sonuçlar ile uyumludur [300].

NET'lerdeki hücre dışı DNA'nın nükleazlar tarafından verimli şekilde degrade edilmemesi, NET immünojenitesinin artmasına neden olur. NET'leri verimli şekilde degrade edemeyen serumlara sahip SLE'li hastalar, daha yüksek tip I İFN aktivitesi göstermiştir. Artan tip I İFN aktivitesi, NET'lerin bozulmuş parçalanmasından kaynaklanabilir. Bu durumda, anti-NET antikorlar içeren komplekslerdeki NET'ler plazmasitoid dendritik hücreler tarafından alınır ve bu hücrelerde tip I İFN'lerin üretimini tetikler.

NET'leri degrade edemeyen aktif SLE'li hastalarının serumlarda kompleman C3 ve C4 bileşenlerinin seviyelerinin düşük olduğu rapor edilmiştir, bu da kompleman sistemi aktivasyonunun göstergesi olabilir. NET'ler komplemanı aktive ederek enflamasyonu indükler ve adaptif immün yanıtları modüle ederek NET'e özgü antikorların üretimine yol açar [345]. Anti-NET aktivitesi ile kompleman aktivasyonu arasındaki mekanik ilişkiyi aydınlatmak için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Romatoid artrit ve kontrol gruplarına göre PsA grubunun serum LL-37 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti. Sağlıklı kontrol ile RA grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı. LL-37 de dahil olmak üzere katyonik antimikrobiyal peptitler psöriatik keratinositler ve nötrofillerin tarafından, degranülasyonu veya NETozis sırasında salınır. Anti-karbamillenmiş peptit otoantikorları (anti-CarPAb'ler) yakın zamanda sadece RA'da değil aynı zamanda PsA'da da plazmada tanımlanmıştır [346].

PsA'da bu peptidin bir otoantijen rolü alarak anti-LL-37 otoantikorların hedefi olduğu gösterilmiştir [327]. PsA'lı hastalarda, RA'lı hastalara kıyasla daha yüksek bulunan LL-37 seviyeleri, muhtemelen PsA'nın artan doğuştan gelen bağışıklık tepkileri, cilt tutulumu, farklı sitokin ortamları ve anti-LL-37 antikorların etkileri dahil olmak üzere benzersiz immünopatolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. PsA'lı hastalarda anti-LL-37 antikorlarının varlığı, normal temizleme mekanizmalarını engelleyen bağışıklık kompleksleri oluşturarak kanda daha yüksek LL-37 düzeyleri saptanmasına muhtemelen katkıda bulunur.

Anti-LL-37 antikorları, LL-37'ye bağlanarak immün kompleksler oluşturabilir. Bu kompleksler, serbest LL-37'ye kıyasla daha büyük ve daha stabil olabilir, bu da LL-37'nin hızlı bir şekilde parçalanmasını veya proteazlar tarafından temizlenmesini engelleyebilir. LL-37'ye bağlanan antikorlar, peptidin, alımına ve temizlenmesine aracılık eden hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşimini değiştirebilir. Örneğin, LL-37 alımında yer alan formil

peptid reseptörleri (FPR'ler), LL-37'nin antikora bağlı formunu etkili bir şekilde tanımayabilir, bu da hücrel içselleştirmeyi ve klirensi azaltabilir. Farklı sitokin profilleri, LL-37'nin iki hastalık arasındaki farklı seviyelerini açıklayabilir. PsA, İL-17, İL-23 ve TNF- α gibi sitokinlerin yüksek seviyeleri ile karakterize edilir ve bu sitokinler LL-37 ekspresyonunu artırabilir.

Geçmişte yapılan çalışmalar stres altındaki keratinositlerin salgıladığı DNA'nın LL-37 ile etkileşime girmesiyle teşvik edildiğini göstermektedir. DNA-LL-37 kompleksi, pDC hücreler üzerinde bulunan TLR-9'a bağlanır ve İFN- α salınımını tetikler; İFN- α , miyeloid dendritik hücrelerin uyarılmasını sağlar; miyeloid dendritik hücrelerin lenf düğümüne göç ederek naif T hücrelerinin Th1 ve Th17 hücrelerine farklılaşmasına ve cilde göç etmesine neden olur. Dermise girdikten sonra Th1 hücreleri İFN- γ ve TNF- α salgılar, Th17 hücreleri ise kemokinler, TNF- α , İL-1, İL-17 ve İL-22'yi üretir [293-295]. İL-17A, İL-22 ve TNF- α birlikte, kutanöz İL-19 S100A7, S100A8, S100A9 sentezini ve İL-1 β , İL-20, CXCL-8, MMP-1, OSCAR ve RANKL'ın gibi faktörlerin üretiminin artmasına neden olurlar [296, 263]. OSCAR'ın ligandına bağlanması, RANK liganda ek olarak monositlerin osteoklasta farklılaşmasını teşvik eden genleri aktive etmek için ikinci bir sinyal sağlar. Bu işlem sonucunda TNF- α osteoklastogenezi ve kemik rezorpsiyonu teşvik eder [286]. Geçmişte yapılan çalışmalar nötrofillerin saldırdığı NET'lerin, DNA'yı tanıyan TLR9 aracılığıyla pDC'leri aktive edebileceğini ve bu kompleksler tarafından aktive edilen pDC'lerin tip I interferon ürettiğini göstermiştir. Serbest insan DNA'sı, pDC'lere giremez ve bu hücreleri aktive edemez, ancak LL-37 ile kompleks halinde olduğunda bu yeteneği kazanabilir. LL-37, kendi DNA parçalarının çözünmez partiküller halinde toplanmasını indükler ve nükleazlar tarafından ekstraselüler bozulmadan korunmasını sağlar. Bu sürecin, DNA'nın pDC'lerin hücre içi TLR9 bölmelerine girebilme yeteneği için bir ön koşul olduğu bulunmuştur. Çünkü sadece LL-37 içeren DNA kompleksleri bu tür partikülleri oluşturur ve pDC'leri İFN- α üretmesi için uyarır; LL-37 içermeyen DNA kompleksleri ise bu yeteneği göstermez [217]. LL-37'nin DNA'yı çözünmez hale getirerek nükleazlar tarafından parçalanmasını önlemesi, hasta serumlarının NET'leri degrade etme konusunda sınırlı yetenek göstermesinin nedenlerinden biri olabilir. PsA'da NET'lerin dendritik hücreleri İFN- α üretmesi için uyarıp uyaramayacağını göstermek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

PsA, RA ve kontrol grubu içerisinde serum LL-37 düzeyi ölçümleri ile, uyarılmış ve

uyarılmamış nötrofillerin NETozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir korelasyon tespit edilmedi. LL-37, keratinositler, hava yolu, oküler yüzey, üreme organları ve kolondaki epitel hücreleri, miyelositler, mezenkimal stromal hücreler gibi birçok doku hücresinde eksprese edilir. Bağışıklık sisteminde ise NK hücreler, nötrofiller, mast hücreler, DC'ler ve makrofajlar LL-37 üretir. Bu nedenle NETozis ve LL-37 düzeyleri arasında korelasyon saptanmamıştır. RA ve PsA tanısı alan hasta gruplarında hafif-orta derecede hasta olanlarla ağır hasta olanlar arasında da LL-37 düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Çalışmalarda, nötrofilleri kandan ayırmak için genellikle 500 kDa molekül ağırlığına sahip dekstran kullanılmaktadır. Çalışmamızda 76 kDa molekül ağırlığına sahip dekstranı nötrofilleri ayırmak için optimize etmeye karar verdik ve %90'nın üzerinde saflıkta nötrofiller izole edildi. Hastaların periferik venöz kanından izole edilen nötrofil yüzdesine bakıldığında, RA'lı hastalarda %93,4, PsA'lı hastalarda %94,0 ve kontrol grubunda %93 oranında nötrofil izole edildi. Bu yönden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık tespit edilmedi. Bu yöntem literatüre, nötrofillerin etkili bir şekilde ayrılması için alternatif bir yaklaşım sunmaktadır ve 76 kDa dekstranın bu amaçla başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada dahil, nadir hastalıkların en önemli sınırlamalarından birisi istatistiksel açıdan yeterli olsa da geniş toplum gruplarında bu değerlendirmelerin yapılamamasıdır. Bu çalışmanın daha geniş bir toplum gruplarında yapılması çalışmanın bu açıdan sınırlılığını ortadan kaldıracaktır. Çalışmamızın sinoviyal sıvıda ve deri lezyonlarındaki olayları doğrudan gösterememesi ve serumdaki sistemik düzeyler üzerinden çalışma grubundaki hastaların değerlendirilmesi, bu çalışmanın en önemli sınırlamalarından birisidir. Biz bu çalışmaya başladığımızda PsA hastalığında NETozis'in rolünü araştıran hiçbir çalışma mevcut olması nedeniyle, bu çalışma bu alanda yapılacak çalışmalar için bir ön ve öncü çalışma olarak ele alınabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada psöriatik artrit hastalarından izole edilen nötrofillerinin romatoid artrit hastaları ve sağlıklı bireylere göre NET formasyonunu indükleme yeteneği ve bunun hastalığın şiddeti ile ilişkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda PsA, RA ve kontrol gruplarında nötrofillerin PMA ile uyarılması ile bu hücrelerin NET formasyonunu indüklemeye duyarlılıkları araştırılmıştır. PsA'lı hastalardan alınan serumların sağlıklı kişilerin nötrofilleri üzerinde NET'leri parçalama kabiliyetini belirlemek için, nötrofil hücre kültüründe oluşan NET'ler PsA'lı hastaların serumu ile inkübe ederek araştırılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak, aynı gruplarda, serumda NET formasyonunu etkileyebilecek bir faktör olan, LL-37 seviyeleri de ölçülmüştür. Çalışmamızda nötrofilleri kandan ayırmak için 76 kDa molekül ağırlığına sahip dekstran optimize edildi.

Sağlıklı kontrol grubuna kıyasla PsA ve RA gruplarındaki uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NET formasyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Psöriatik artrit ve romatoid artrit tanısı alan gruplar içerisinde ağır hasta olanlarda, hafif-orta derecede hasta olanlara göre NETozis düzeyleri daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. PsA grubunda PMA ile uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri farkı RA ve sağlıklı kontrol grubuna göre daha fazla bulunmuştur. RA'lı hastalar ve sağlıklı kontrolarda benzer bir artış görülse de, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuçlar, PsA'lı hastalarda nötrofillerin PMA ile uyarıldığında daha fazla NET ürettiğini ve bu durumun RA'lı hastalar ve sağlıklı bireylere kıyasla daha belirgin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda sağlıklı kontrol grubunda salınan NET'lerin, PsA'lı hastaların serumu ile inkübasyondan sonra medyan degradasyon yüzdesi 75,2 olarak saptanmıştır. Bu PsA serumunda nükleazlar tarafından NET degradasyonun azalmasını ve NET bileşenlerin daha fazla serumda kaldığını göstermektedir. Romatoid artrit ve kontrol gruplarına göre PsA grubunun LL-37 serum düzeyinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı kontrol ile romatoid artrit arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır. PsA, RA ve kontrol grubu içerisinde serum LL-37 düzeyleri ile uyarılmış ve uyarılmamış nötrofillerde NETozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir korelasyon tespit edilmemiştir. RA ve PsA tanısı alan grup içerisinde hafif-orta derecede hasta olanlarla ağır hasta olanlar arasında da serum LL-37 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Hastaların periferik venöz kanından izole edilen nötrofil yüzdesine bakıldığında, RA'lı hastalarda %93,4, PsA'lı hastalarda %94,0 ve kontrol grubunda %93 oranında nötrofil izole edildi. Bu yönden istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık tespit edilmedi.

Psöriatik artritte NET'ler, antimikrobiyal peptit LL-37 ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimi anlamak, hastalığın patogenezi hakkındaki bilgimizi önemli ölçüde artırabilir ve yeni terapötik hedeflerin ve stratejilerin tanımlanmasına yol açabilir. NET oluşumunu azaltmayı veya bunların bozulmasını teşvik etmeyi amaçlayan tedaviler, enflamasyonun azaltılmasına yardımcı olabilir. Hastalarda NET'lerin ve LL-37'nin rolünü anlamak, hastaları hastalık mekanizmalarına göre sınıflandırmaya yardımcı olabilir. Bu, her hastada aktif olan spesifik yolları hedef alan daha kişiselleştirilmiş terapötik yaklaşımlara yol açabilir.

KAYNAKLAR

1. Edwards, S. W. (1994). *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. (First published). New York: Cambridge University Press, 33-76.
2. Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., and Sendo, F. (1996). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 59, 229-240.
3. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8, 668-676.
4. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., and Weiss, D. S. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-1535.
5. Thomas, G. M., Carbo, C., Curtis, B. R., Martinod, K., Mazo, I. B., Schatzberg, D., Cifuni, S. M., Fuchs, T. A., von Andrian, U. H., Hartwig, J. H., Aster, R. H., and Wagner, D. D.. (2012). Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood*, 119, 6335-6343.
6. Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., Lohmeyer, J., and Preissner, K. T. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *Plos One*, 7, e32366.
7. Poon, I. K., Baxter, A. A., Lay, F. T., Mills, G. D., Adda, C. G., Payne, J. A., Phan, T. K., Ryan, G. F., White, J. A., Veneer, P. K., van der Weerden, N. L., Anderson, M. A., Kvensakul, M., and Hulett, M. D.. (2014). Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *eLife*, 3, e01808.
8. Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710-720.
9. Kawabata, K., Hagio, T., and Matsuoka, S. (2002). The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *European Journal of Pharmacology*, 451, 1-10.
10. Brill, A., Fuchs, T. A., Chauhan, A. K., Yang, J. J., De Meyer, S. F., Köllnberger, M., Wakefield, T. W., Lämmle, B., Massberg, S., and Wagner, D. D. (2011). von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*, 117, 1400-1407.
11. Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönermarck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., Gröne, H. J., Brinkmann, V., and Jenne, D. E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine*, 15, 623-625.

12. Tang, S., Zhang, Y., Yin, S. W., Gao, X. J., Shi, W. W., Wang, Y., Huang, X., Wang, L., Zou, L. Y., Zhao, J. H., Huang, Y. J., Shan, L. Y., Gounni, A. S., Wu, Y. Z., and Zhang, J. B. (2015). Neutrophil extracellular trap formation is associated with autophagy-related signaling in ANCA-associated vasculitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 180, 408-418.
13. Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., Rubin, C. J., Zhao, W., Olsen, S. H., Klinker, M., Shealy, D., Denny, M. F., Plumas, J., Chaperot, L., Kretzler, M., Bruce, A. T., and Kaplan, M. J. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 187, 538-552.
14. Khandpur, R., Carmona Rivera, C., Giri, A. V., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J. S., Friday, S., Li, S., Patel, R. M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D. A., Pennathur, S., and Kaplan, M. J. (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science Translational Medicine*, 5, 40-45.
15. Mabuchi, T, Chang T. W., Quinter S., and Hwang S. T., (2012) Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 65(1), 4-11.
16. Hu, S. C. Yu, H. S., Yen, F. L., Lin, C. L., Chen, G. S., and Lan, C. C. (2016). Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human beta-defensin 2 production in epidermal keratinocytes. *Scientific Reports*, 5(6), 31119.
17. Gladman, D. D., Stafford-Brady F., Chang, C. H., Lewandowski. K., and Russell M. L., (1990) Longitudinal study of clinical and radiological progression in psoriatic arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 17: 809-812.
18. McHugh, N. J., Balachrishnan, C., and Jones, S. M. (2003) Progression of peripheral joint disease in psoriatic arthritis: a 5-yr prospective study. *Rheumatology (Oxford)*, 42, 778-783.
19. Villani, A. P., Rouzaud, M., Sevrain, M., Barnette, T., Paul, C., Richard, M. A., Beylot-Barry, M., Misery, L., Joly, P., Le Maitre, M., Aractingi, S., Aubin, F., Cantagrel, A., Ortonne, J. P., and Jullien, D. (2015) Prevalence of undiagnosed psoriatic arthritis among psoriasis patients: systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73, 242-248.
20. Kerschbaumer, A., Fenzl, K. H., Erlacher, L., and Aletaha. D. (2016). An overview of psoriatic arthritis - epidemiology, clinical features, pathophysiology and novel treatment targets. *Springer*, 128(21), 791-795.
21. Gladman, D. D., Antoni, C., Mease, P., Clegg, D. O. and Nash, P. (2005). Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Annals of Rheumatic Diseases*, 64, ii14-ii17.
22. Nauseef, W. M. and Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15, 602-611.

23. Ballesteros, I., Rubio-Ponce, A., Genua, M., Lusito, E., Kwok, I., Fernández-Calvo, G., Khoiratty, T. E., van Grinsven, E., González-Hernández, S., Nicolás-Ávila, J. Á., Vicanolo, T., Maccataio, A., Benguría, A., Li, J. L. Y., Adrover, J. M., Aroca-Crevillen, A., Quintana, J. A., Martín-Salamanca, S., Mayo, F., Ascher, S., Barbiera, G., Soehnlein, O., Gunzer, M., Ginhoux, F., Sánchez-Cabo, F., Nistal-Villán, E., Schulz, C., Dopazo, A., Reinhardt, C., Udalova, I. A., Ng, L. G., Ostuni, R. and Hidalgo, A. (2020). Co-option of neutrophil fates by tissue environments. *Cell*, 183, 1282-1297.
24. Noubouossie, D. F., Reeves, B. N., Strahl, B. D. and Key, N. S. (2019). Neutrophils: back in the thrombosis spotlight. *Blood*, 133, 2186-2197.
25. Wigerblad, G. and Kaplan, M. J. (2023). Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, 23(5) 274-288.
26. Tak, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J. A. and Koenderman, L. (2013). What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *The Journal of Leukocyte Biology*, 94, 595-601.
27. Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A. M., 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, 625-627.
28. Scheiermann, C., Frenette, P. S., and Hidalgo, A. (2015). Regulation of leucocyte homeostasis in the circulation. *Cardiovascular Research*, 107, 340-351.
29. Casanova-Acebes, M., Nicolas, D., Ligerio, V., García-Silva, F., Balboa, L., Barroso, A. I., Gómez-Cabañas, D., Martín-Salamanca, D., Vargas, P., Sanchez-Gomez, N., Fernández-Ruiz, E., Sepúlveda, J. M., Bataller, E., Brenes, A. J., Torres, J. L., and Hidalgo, A. (2018). Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. *Journal of Experimental Medicine*, 215, 2778-2795.
30. Ng, L. G., Ostuni, R., and Hidalgo, A. (2019). Heterogeneity of neutrophils. *Nature Reviews Immunology*, 19, 255-265.
31. Yipp, B. G., Veerman, C. C., Dalli, K. D., Petri, S. N., Marchant, L. E., Quach, P. F., D'Sa, C. E., Weng, K. D., Le, L. E., Charles, C. M. L., Summers, J. A., Pfeffer, R. S., Tak, M. R., Summers, S. M., Si, D. A. U., Pillay, J. W., Welch, N. J., Colarusso, R. E., Cumming, S. A. J., Coombs, P. F., Patel, M. A., Lacy-Hulbert, A. R., and Hirota, J. A. (2017). The lung is a host defense niche for immediate neutrophil-mediated vascular protection. *Science Immunology*, 2, eaam8929.
32. Nourshargh, S., Hordijk, P. L., and Sixt, M. (2010). Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 366-378.
33. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7, 678-689.
34. Woodfin A., Voisin M. B., Beyrau M., Colom B., Caille D., Diapouli F. M., Nash G. B.,

- Chavakis T., Albelda S. M., Rainger G. E., Meda P., Imhof B. A., and Nourshargh S. (2011). The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature Immunology*, 12, 761-769.
35. Hajishengallis, G., and Chavakis, T. (2013). Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. *Trends in Immunology*, 34, 1-6.
 36. Choi, E. Y., Chavakis E., Czabanka M. A., Langer H. F., Fraemohs L., Economopoulou M., Kundu R. K., Orlandi A., Zheng Y. Y., Prieto D. A., Ballantyne C. M., Constant S. L., Aird W. C., Papayannopoulou T., Gahmberg C. G., Udey M. C., Vajkoczy P., Quertermous T., Dimmeler S., Weber C., and Chavakis T. (2008). Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science*, 322, 1101-1104.
 37. Granot, Z., and Jablonska, J. (2015). Distinct functions of neutrophils in cancer and its regulation. *Mediators of Inflammation*, 2015, 701067.
 38. Wu, C. F., Andzinski, L., Kasnitz, N., Kröger, A., Klawonn, F., Lienenklaus, S., Weiss, S., and Jablonska, J. (2015). The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung. *International Journal of Cancer*, 137(4), 837-847.
 39. Finisguerra, V., Conza, D. G., Di Matteo, M., Serneels, J., Costa, S., Thompson, A. A. R., Wauters, E., Walmsley, S., Prenen, H., Granot, Z., Casazza, A., and Mazzone, M. (2015). MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*, 522(7556), 349-353.
 40. van Egmond, M., and Bakema, J. E. (2013). Neutrophils as effector cells for antibody-based immunotherapy of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 23(3), 190-199.
 41. Deniset, J. F., and Kubes, P. (2018). Neutrophil heterogeneity: bona fide subsets or polarization states. *Journal of Leukocyte Biology*, 103(5), 829-838.
 42. Pember, S. O., Barnes, K. C., Brandt, S. J., and Kinkade, J. M. (1983). Density heterogeneity of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: gradient fractionation and relationship to chemotactic stimulation. *Blood*, 61(6), 1105-1115.
 43. Hacbarth, E., and Kajdacsy-Balla, A. (1986). Lowdensity neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis and Rheumatism*, 29(11), 1334-1342.
 44. Scapini, P., Marini, O., Tecchio, C., and Cassatella, M. A. (2016). Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunological Reviews*, 273(1), 48-60.
 45. Carlucci, P. M., Purmalek, M. M., Dey, A. K., Temesgen-Oyelakin, Y., Sakhardande, S., Joshi, A. A., Lerman, J. B., Fike, A., Davis, M., Chung, J. H., Playford, M. P., Naqi, M., Mistry, P., Gutierrez-Cruz, G., Dell'Orso, S., Naz, F., Salahuddin, T., Natarajan, B., Manna, Z., Tsai, W. L., Gupta, S., Grayson, P., Teague, H., Chen, M. Y., Sun, H. W., Hasni, S., Mehta, N. N., and Kaplan, M. J. (2018). Neutrophil subsets and their gene

- signature associate with vascular inflammation and coronary atherosclerosis in lupus. *Journal of Clinical Investigation*, 3, e99276.
46. Martin, C., Burdon, P. C., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J. C., Williams, T. J., and Rankin, S. M. (2003). Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, 19(4), 583-593.
 47. Evrard, M., Kwok, I. W. H., Chong, S. Z., Teng, K. W. W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J. L., Penny, H. L., Ching, G. C., Devi, S., Adrover, J. M., Li, J. L. Y., Liong, K. H., Tan, L., Poon, Z., Foo, S., Chua, J. W., Su, I-H., Balabanian, K., Bachelier, F., Biswas, S. K., Larbi, A., Hwang, W. Y. K., Madan, V., Koeffler, H. P., Wong, S. C., Newell, E. W., Hidalgo, A., Ginhoux, F., and Ng, L. G. (2018). Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity*, 48(2) 364-379.
 48. Gupta, S., Nakabo, S., Blanco, L. P., O'Neil, L. J., Wigerblad, G., Goel, R. R., Mistry, P., Jiang, K., Carmona-Rivera, C., Chan, D. W., Wang, X., Pedersen, H. L., Gadkari, M., Howe, K. N., Naz, F., Dell'Orso, S., Hasni, S. A., Dempsey, C., Buscetta, A., Frischmeyer-Guerrero, P. A., Kruszka, P., Muenke, M., Franco, L. M., Sun, H. W., and Kaplan, M. J. (2020). Sex differences in neutrophil biology modulate response to type I interferons and immunometabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117, 16481-16491.
 49. Zarbock, A., and Ley, K. (2008). Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American Journal of Pathology*, 172, 1-7.
 50. Selvatici, R., Falzarano, S., Mollica, A., and Spisani, S. (2006). Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*, 534, 1-11.
 51. Chen, Y., Yao, Y., Sumi, Y., Li, A., To, U. K., Elkhail, A., Inoue, Y., Woehrle, T., Zhang, Q., Hauser, C., and Junger, W. G.. (2010). Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Science Signaling*, 3, ra45.
 52. Ley, K. (2002). Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunological Reviews*, 186, 8-18.
 53. Guthrie, L. A., McPhail, L. C., Henson, P. M., and Johnston Jr., R. B. (1984). Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *Journal of Experimental Medicine*, 160, 1656-1671.
 54. El-Benna, J., Dang, P. M., and Gougerot-Pocidalo, M. A. (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in Immunopathology*, 30, 279-289.
 55. Cowland, J. B., and Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological Reviews*, 273, 11-28.

56. Hidalgo, A., Chilvers, E. R., Summers, C., and Koenderman, L. (2019). The neutrophil life cycle. *Trends in Immunology*, 40, 584-597.
57. Mestas, J., and Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology*, 172, 2731-2738.
58. Puga, I., Cols, M., Barra, C. M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., Magri, G., Knowles, D. M., Tam, W., Chiu, A., Bussel, J. B., Serrano, S., Lorente, J. A., Bellosillo, B., Lloreta, J., Juanpere, N., Alameda, F., Baró, T., Díaz de Heredia, C., Torán, N., Català, A., Torrealadell, M., Fortuny, C., Cusí, V., Carreras, C., Diaz, G. A., Blander, J. M., Farber, C.-M., Silvestri, G., Cunningham-Rundles, C., Calvillo, M., Dufour, C., Notarangelo, L. D., Lougaris, V., Plebani, A., Casanova, J.-L., Ganai, S. C., Diefenbach, A., Aróstegui, J. I., Juan, M., Yagüe, J., Mahlaoui, N., Donadieu, J., Chen, K., and Cerutti, A. (2011). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature Immunology*, 13, 170-180.
59. Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., and Cassatella, M. A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews*, 177, 195-203.
60. Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36(5), 705-716.
61. Sadik, C. D., Kim, N. D., and Luster, A. D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, 32, 452-460.
62. Lacy, P. (2005). The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacology and Therapeutics*, 107, 358-376.
63. Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5, 1317-1327.
64. Borregaard, N., and Cowland, J. B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89, 3503-3521.
65. Farrera, C., and Fadeel, B. (2013). Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *Journal of Immunology*, 191(5), 2647-2656.
66. Mark, M. J., Hollands, A., Sanderson-Smith, M. L., Cole, J. N., Kirk, J. K., Henningham, A., McArthur, J. D., Dinkla, K., Aziz, R. K., Kansal, R. G., Simpson, A. J., Buchanan, J. T., Chhatwal, G. S., Kotb, M., and Nizet, V. (2007). DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. *Nature Medicine*, 13, 981-985.
67. Liang, C., Lian, N., and Li, M. (2022). The emerging role of neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 900895.
68. Jenne, C. N., Wong, C. H. Y., Zemp, F. J., McDonald, B., Rahman, M. M., Forsyth, P. A., McFadden, G., and Kubes, P. (2013). Neutrophils recruited to sites of infection protect

from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host and Microbe*, 13(2), 169-180.

69. Abi Abdallah, D. S., Lin, C., Ball, C. J., King, M. R., Duhamel, G. E., and Denkers, E. Y. (2012). Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infection and Immunity*, 80, 768-777.
70. Pilsczek, F. H., Salina, D., Poon, K. K., Fahey, C., Yipp, B. G., Sibley, C. D., Robbins, S. M., Green, F. H. Y., Surette, M. G., Sugai, M., Bowden, M. G., Hussain, M., Zhang, K., and Kubes, P. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. *Journal of Immunology*, 185(12), 7413-7425.
71. Bonilla, M. C., Quiros, O. N., Wendt, M., Hennig-Pauka, I., Mörgelin, M., von Köckritz-Blickwede, M., and de Buhr, N. (2022). New insights into neutrophil extracellular trap (NETs) formation from porcine neutrophils in response to bacterial infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8953.
72. Li, R. H. L., Ng, G., and Tablin, F. (2017). Lipopolysaccharide-induced neutrophil extracellular trap formation in canine neutrophils is dependent on histone H3 citrullination by peptidylarginine deiminase. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 193-194, 29-37.
73. Qiu, S-L., Zhang, H., Tang, Q.-Y., Bai, J., He, Z.-Y., Zhang, J.-Q., Li, M.-H., Deng, J.-M., Liu, G.-N., and Zhong, X.-N. (2017). Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax*, 72, 1084-1093.
74. Joshi, M. B., Lad, A., Bharath Prasad, A. S., Balakrishnan, A., Ramachandra, L., and Satyamoorthy, K. (2013). High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Letters*, 587(14), 2241-2246.
75. Shu, Q., Zhang, N., Liu, Y., Wang, X., Chen, J., Xie, H., Pan, F., Zhao, L., Ding, X., Wen, Y., Wang, L., Xie, W., Lu, J., Su, G., Peng, H., and Yang, P. (2023). IL-8 triggers neutrophil extracellular trap formation through a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase- and mitogen-activated protein kinase pathway-dependent mechanism in uveitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 64(4), 19.
76. Mitroulis, I., Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Skendros, P., Apostolidou, E., Kourtzelis, I., and Ritis, K. (2011). Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*, 6, e29318.
77. Fuchs, T. A., 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. *Journal of Cell Biology*, 176, 231-241.
78. Parker, H., Dragunow, M., Hampton, M. B., Kettle, A. J., and Winterbourn, C. C. (2012). Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *Journal of Leukocyte Biology*, 92, 841-849.

79. Chen, Y., Li, X., Lin, X., Liang, H., Liu, X., Zhang, X., Zhang, Q., Zhou, F., Yu, C., Lei, L., and Xiu, J. (2022). Complement C5a induces the generation of neutrophil extracellular traps by inhibiting mitochondrial STAT3 to promote the development of arterial thrombosis. *Thrombosis Journal*, 20(1), 24.
80. Aleyd, E., van Hout, M. W. M., Ganzevles, S. H., Hoebe, K. A., Everts, V., Bakema, J. E., and van Egmond, M. (2014). IgA enhances NETosis and release of neutrophil extracellular traps by polymorphonuclear cells via Fc α receptor I. *Journal of Immunology*, 192(5), 2374-2383.
81. Damascena, H. L., Silveira, W. A. A., Castro, M. S., and Fontes, W. (2022). Neutrophil activated by the famous and potent PMA (Phorbol Myristate Acetate). *Cells*, 11(18), 2889.
82. Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N. V., Zbytnuik, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., de Boisleury Cheavance, A., Zhang, K., Conly, J., and Kubes, P. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*, 18, 1386-1393.
83. Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 577-582.
84. Hakkim, A., Fuchs, T. A., Martinez, N. E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., and Waldmann, H. (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature Chemical Biology*, 7, 75-77.
85. Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., and Papayannopoulos, V. (2014). A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports*, 8, 883-896.
86. Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191, 677-691.
87. Pingxin, L., Ming, L., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Na, X., and Yanming, W. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1853-1862.
88. Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S., and Radic, M. (2009). Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *Journal of Innate Immunity*, 1, 194-201.
89. Bawadekar, M., Shim, D., Johnson, C. J., Warner, T. F., Rebernick, R., Damgaard, D., Nielsen, C. H., Pruijn, G. J. M., Nett, J. E., and Shelef, M. A. (2017). Peptidylarginine deiminase 2 is required for tumor necrosis factor alpha-induced citrullination and arthritis, but not neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Autoimmunity*, 80, 39-47.
90. Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., DeVinney, R., Doig, C. J., Green, F. H. Y., and Kubes, P. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine*, 13, 463-469.

91. Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., and Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, 114, 2619-2622.
92. Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., and Simon, H. U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death and Differentiation*, 16(11), 1438-1444.
93. Yousefi, S., Gold, J. A., and Andina, N. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature Medicine*, 14(9), 949-953.
94. Kolaczowska, E., Jenne, C. N., Surewaard, B. G. J., Thanabalasuriar, A., Lee, W. Y., Sanz, M. J., Mowen, K., Opdenakker, G., and Kubes, P. (2015). Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nature Communications*, 6, 6673.
95. Yipp, B. G. and Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it? *Blood* 122, 2784-2794.
96. Jorch, S. K., and Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature Medicine*, 23, 279-287.
97. Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., and Papayannopoulos, V. N. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, 15, 1017-1025.
98. Pieterse, E., Jeremic, I., Czegley, C., Weidner, D., Biermann, M. H. C., Veissi, S., Maueröder, C., Schauer, C., Bilyy, R., Dumych, T., Hoffmann, M., Munoz, L. E., Bengtsson, A. A., Schett, G., van der Vlag, J., and Herrmann, M. (2016). Blood-borne phagocytes internalize urate microaggregates and prevent intravascular NETosis by urate crystals. *Scientific Reports*, 6, 38229.
99. Vong, L., Lorentz, R. J., Assa, A., Glogauer, M., and Sherman, P. M. (2014). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Immunology*, 192, 1870-1877.
100. Floyd, M., Winn, M., Cullen, C., Sil, P., Chassaing, B., Yoo, D.-G., Gewirtz, A. T., Goldberg, J. B., McCarter, L. L., and Rada, B. (2016). Swimming motility mediates the formation of neutrophil extracellular traps induced by flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 12, e1005987.
101. Amara, N., Cooper, M. P., Voronkova, M. A., Webb, B. A., Lynch, E. M., Kollman, J. M., Ma, T., Yu, K., Lai, Z., Sangaraju, D., Kayagaki, N., Newton, K., Bogyo, M., Staben, S. T., and Dixit, V. M. (2021). Selective activation of PFKL suppresses the phagocytic oxidative burst. *Cell*, 184(17), 4480-4494.e15.
102. Chang, Y. C., Olson, J., Beasley, F. C., Tung, C., Zhang, J., Crocker, P. R., Varki, A., and Nizet, V. (2014). Group B *Streptococcus* engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses in vivo. *PLoS Pathogens*, 10, e1003846.

103. Khatua, B., Bhattacharya, K. and Mandal, C. (2012). Sialoglycoproteins adsorbed by *Pseudomonas aeruginosa* facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9. *Journal of Leukocyte Biology*, 91, 641-655.
104. Milligan, K. L., Mann, D., Rump, A., Anderson, V. L., Hsu, A. P., Kuhns, D. B., Zerbe, C. S., and Holland, S. M. (2016). Complete myeloperoxidase deficiency: beware the “false-positive” dihydrorhodamine oxidation. *The Journal of Pediatrics*, 176, 204-206.
105. Byrd, A. S., O'Brien, X. M., Johnson, C. M., Lavigne, L. M., and Reichner, J. S. (2013). An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *Journal of Immunology*, 190, 4136-4148.
106. Sorensen, O. E., Clemmensen, S. N., Dahl, S. L., Østergaard, O., Heegaard, N. H., Glenthøj, A., Nielsen, F. C., and Borregaard, N. (2014). Papillon-Lefevre syndrome patient reveals species-dependent requirements for neutrophil defenses. *Journal of Clinical Investigation*, 124, 4539-4548.
107. Eilers, B., Mayer-Scholl, A., Walker, T., Tang, C., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil antimicrobial proteins enhance *Shigella flexneri* adhesion and invasion. *Cell Microbiology*, 12, 1134-1143.
108. Martinod, K., Tobias A. Fuchs, Naamah L. Zitomersky, Siu Ling Wong, Melanie Demers, Maureen Gallant, Yanming Wang, and Denisa D. Wagner. (2015). PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. *Blood*, 125(12), 1948-1956.
109. Moorthy, A. N., Rai, P., Jiao, H., Wang, S., Tan, K. B., and Qin, L. (2016). Capsules of virulent pneumococcal serotypes enhance formation of neutrophil extracellular traps during in vivo pathogenesis of pneumonia. *Oncotarget*, 7, 19327-19340.
110. Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N., and Akira, S. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host and Microbe*, 12, 109-116.
111. Hemmers, S., Teijaro, J. R., Arandjelovic, S. and Mowen, K. A. (2011). PAD4 mediated neutrophil extracellular trap formation is not required for immunity against influenza infection. *PLoS ONE*, 6, e22043.
112. Ellis, G. T., Davidson, S., Crotta, S., Branzk, N., Papayannopoulos, V., and Wack, A. (2015). TRAIL⁺ monocytes and monocyte-related cells cause lung damage and thereby increase susceptibility to influenza-Streptococcus pneumoniae coinfection. *EMBO Reports*, 16, 1203-1218.
113. Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., Taylor, F. B., Esmon, N. L., Lupu, F., and Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*, 15, 1318-1321.
114. Abrams, S. T., Zhang, N., Manson, J., Liu, T., Dart, C., Baluwa, F., Wang, S. S., Brohi,

- K., Kipar, A., Yu, W., Wang, G., and Toh, C.-H. (2013). Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187, 160-169.
115. Takeuchi, H., Gomi, T., Shishido, M., Watanabe, H., and Suenobu, N. (2010). Neutrophil elastase contributes to extracellular matrix damage induced by chronic low-dose UV irradiation in a hairless mouse photoaging model. *Journal of Dermatological Science*, 60(3), 151-158.
 116. Chen, X., Niyonsaba, F., Ushio, H., Hara, M., Yokoi, H., Matsumoto, K., Saito, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2007). Antimicrobial peptides human β -defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *European Journal of Immunology*, 37(2), 434-444.
 117. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2015). Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*, 349, 316-320.
 118. Savchenko, A. S., Borissoff, J. I., Martinod, K., De Meyer, S. F., Gallant, M., Erpenbeck, L., Brill, A., Wang, Y., and Wagner, D. D. (2014). VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood*, 123, 141-148.
 119. Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A. O., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L., Wiedenbauer, E.-M., Krautgartner, W. D., Stoiber, W., Belohradsky, B. H., Rieber, N., Kormann, M., Koller, B., Roscher, A., Roos, D., Griese, M., Eickelberg, O., Döring, G., Mall, M. A., and Hartl, D. (2010). CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nature Medicine*, 16, 1018-1023.
 120. Cantin, A. M., (1998) DNase I acutely increases cystic fibrosis sputum elastase activity and its potential to induce lung hemorrhage in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157, 464-469.
 121. Greene, CM., and McElvaney, N. G. (2009). Proteases and antiproteases in chronic neutrophilic lung disease - relevance to drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 158, 1048-1058.
 122. Yoo, D. G., Winn, M., Pang, L., Moskowitz, S. M., Malech, H. L., Leto, T. L., and Rada, B. (2014). Release of cystic fibrosis airway inflammatory markers from *Pseudomonas aeruginosa*-stimulated human neutrophils involves NADPH oxidase-dependent extracellular DNA trap formation. *Journal of Immunology*, 192, 4728-4738.
 123. Young, R. L., Malcolm, K. C., Kret, J. E., Caceres, S. M., Poch, K. R., Nichols, D. P., Taylor-Cousar, J. L., Saavedra, M. T., Randell, S. H., Vasil, M. L., Burns, J. L., Moskowitz, S. M., and Nick, J. A. (2011). Neutrophil extracellular trap (NET)- mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS ONE*, 6, e23637.
 124. Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T. A., Wong, S. L., Brill, A., Gallant, M., Hu, J., Wang, Y., and Wagner, D. D. (2013). Neutrophil histone modification by peptidylarginine

deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 8674-8679.

125. Etulain, J., Martinod, K., Wong, S. L., Cifuni, S. M., Schattner, M., and Wagner, D. D. (2015). P Selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*, 126, 242-246.
126. Rossaint, J., Kühne, K., Skupski, J., Van Aken, H., Looney, M. R., Hidalgo, A., and Zarbock, A. (2016). reveals how neutrophil-derived extracellular vesicles are directed to enable platelet-mediated innate immune responses. *Nature Communications*, 7, 13464.
127. von Brühl, M. L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Köllnberger, M., Byrne, R. A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Eckart, A., Haidari, S., Rudelius, M., Schulz, C., Echtler, K., Brinkmann, V., Schwaiger, M., Preissner, K. T., Wagner, D. D., Mackman, N., Engelmann, B., and Massberg, S. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 209, 819-835.
128. Massberg, S., Gahl, L., von Bruehl, M. L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A. B., Konrad, I., Kennerknecht, E., Reges, K., Holdenrieder, S., Braun, S., Reinhardt, C., Spannagl, M., Preissner, K. T., and Engelmann, B. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature Medicine*, 16, 887-896.
129. Leppkes, M., Maueröder, C., Hirth, S., Nowecki, S., Günther, C., Billmeier, U., Paulus, S., Biermann, M., Munoz, L. E., Hoffmann, M., Wildner, D., Croxford, A. L., Waisman, A., Mowen, K., Jenne, D. E., Krenn, V., Mayerle, J., Lerch, M. M., Schett, G., Wirtz, S., Neurath, M. F., Herrmann, M., and Becker, C. (2016). Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nature Communications*, 7, 10973.
130. Narasaraaju, T., Yang, E., Samy, R. P., Ng, H. H., Poh, W. P., Liew, A. A., Phoon, M. C., van Rooijen, N., and Chow, V. T. (2011). Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *The American Journal of Pathology*, 179, 199-210.
131. Arcanjo, A., Logullo, J., Menezes, C. C. B., Giangiarulo, T. C. S. C., Reis, M. C. D., Castro, G. M. M. D., Fontes, Y. d. S., Todeschini, A. R., Freire-de-Lima, L., Decoté-Ricardo, D., Ferreira-Pereira, A., Freire-de-Lima, C. G., Barroso, S. P. C., Takiya, C., Conceição-Silva, F., Savino, W., and Morrot, A. (2020). The emerging role of neutrophil extracellular traps in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (COVID-19). *Scientific Reports*, 10, 19630.
132. Park, J. H., and Lee HK. (2020). Re-analysis of single cell transcriptome reveals that the NR3C1-CXCL8-neutrophil axis determines the severity of COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 28(11), 2145.
133. Yaqinuddin, A., and Kashir J. (2020). Novel therapeutic targets for SARS-CoV-2-induced acute lung injury: targeting a potential IL-1 β /neutrophil extracellular traps feedback loop.

Medical Hypotheses, 143, 109906.

134. Obermayer, A., Jakob, L., Haslbauer, J. D., Matter, M. S., Tzankov, A., and Stoiber, W. (2021). Neutrophil extracellular traps in fatal COVID-19-associated lung injury. *Disease Markers*, 2021, 1-10.
135. Torres-Ruiz, J., Absalón-Aguilar, A., Nuñez-Aguirre, M., Pérez-Fragoso, A., Carrillo-Vázquez, D. A., Maravillas-Montero, J. L., Mejía-Domínguez, N. R., Llorente, L., Alcalá-Carmona, B., Lira-Luna, J., Núñez-Álvarez, C., Juárez-Vega, G., Meza-Sánchez, D., Hernández-Gilsoul, T., Tapia-Rodríguez, M., and Gómez-Martín, D. (2021). Neutrophil Extracellular Traps Contribute to COVID-19 Hyperinflammation and Humoral Autoimmunity. *Cells*, 10, 2545.
136. Ouwendijk, W., Raadsen, M. P., van Kampen, J. J. A., Verdijk, R. M., von der Thusen, J. H., Guo, L., Hoek, R. A. S., van den Akker, J. P. C., Endeman, H., Langerak, T., Molenkamp, R., Gommers, D., Koopmans, M. P. G., van Gorp, E. C. M., Verjans, G. M., and Haagmans, B. L. (2021). High levels of neutrophil extracellular traps persist in the lower respiratory tract of critically ill patients with coronavirus disease 2019. *The Journal of Infectious Diseases*, 223, 1512-21.
137. Zuo, Y., Yalavarthi, S., Navaz, S. A., Hoy, C. K., Harbaugh, A., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., Shi, H., Kanthi, Y., and Knight, J. S. (2021). Autoantibodies stabilize neutrophil extracellular traps in COVID-19. *Journal of Clinical Investigation*, 6, e150111.
138. Zenaro, E., Pietronigro, E., Della Bianca, V., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., Turano, E., Rossi, B., Angiari, S., Dusi, S., Montresor, A., Carlucci, T., Nanì, S., Tosadori, G., Calciano, L., Catalucci, D., Berton, G., Bonetti, B., and Constantin, G. (2015). Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nature Medicine*, 21, 880-886.
139. Schauer, C., Janko, C., Munoz, L. E., Zhao, Y., Kienhöfer, D., Frey, B., Lell, M., Manger, B., Rech, J., Naschberger, E., Holmdahl, R., Krenn, V., Harrer, T., Jeremic, I., Bilyy, R., Schett, G., Hoffmann, M., and Herrmann, M. (2014). Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature Medicine*, 20, 511-517.
140. Szekanecz, Z., McInnes, I. B., Schett, G., Szamosi, S., Benkő, S., and Szűcs, G. (2021). Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 17, 585-595.
141. Herrada, A. A., Escobedo, N., Iruretagoyena, M., Valenzuela, R. A., Burgos, P., and Cuitino, L. (2019). Innate immune cells' contribution to systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 10, 772.
142. Barrat, F. J., Crow, M. K., and Ivashkiv, L. B. (2019). Interferon target-gene expression and epigenomic signatures in health and disease. *Nature Immunology*, 20, 1574-1583.
143. Zhao, J., Ma, J., Deng, Y., Kelly, J. A., Kim, K., Bang, S.-Y., Lee, H.-S., Li, Q.-Z., Wakeland, E. K., Qiu, R., Liu, M., Guo, J., Li, Z., Tan, W., Rasmussen, A., Lessard, C. J., Sivils, K. L., Hahn, B. H., Grossman, J. M., Kamen, D. L., Gilkeson, G. S., Bae, S.-C.,

- Gaffney, P. M., Shen, N., and Tsao, B. P. (2017). A missense variant in NCF1 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Nature Genetics*, 49, 433-437.
144. Reshetnyak, T., and Nurbaeva, K. (2023). The role of neutrophil extracellular traps (NETs) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13581.
 145. Knight, J. S., Carmona-Rivera, C., and Kaplan, M. J. (2012). Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 3, 380.
 146. Guiducci, C., Tripodo, C., Gong, M., Sangaletti, S., Colombo, M. P., Coffman, R. L., and Barrat, F. J. (2010). Autoimmune skin inflammation is dependent on plasmacytoid dendritic cell activation by nucleic acids via TLR7 and TLR9. *Journal of Experimental Medicine*, 207, 2931-2942.
 147. Toussaint, M., Jackson, D. J., Swieboda, D., Guedán, A., Tsourouksoglou, T.-D., Ching, Y. M., Radermecker, C., Makrinioti, H., Aniscenko, J., Bartlett, N. W., Edwards, M. R., Solari, R., Farnir, F., Papayannopoulos, V., Bureau, F., Marichal, T., and Johnston, S. L. (2017). Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nature Medicine*, 23, 681-691.
 148. Imanishi, T., Ishihara, C., El Sherif Gadelhaq Badr, M., Hashimoto-Tane, A., Kimura, Y., Kawai, T., Takeuchi, O., Ishii, K. J., Taniguchi, S., Noda, T., Hirano, H., Brombacher, F., Barber, G. N., Akira, S., and Saito, T. (2014). Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nature Communications*, 5, 3566.
 149. Gehrke, N., Mertens, C., Zillinger, T., Wenzel, J., Bald, T., Zahn, S., Tüting, T., Hartmann, G., and Barchet, W. (2013). Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity*, 39, 482-495.
 150. Willis, V., Gizinski, A. M., Banda, N. K., Causey, C. P., Knuckley, B., Cordova, K. N., Luo, Y., Levitt, B., Glogowska, M., Chandra, P., Kulik, L., Robinson, W. H., Arend, W. P., Thompson, P. R., and Holers, V. M. (2011). N- α -Benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-l-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. *The Journal of Immunology*, 186(7), 4396-4404.
 151. Wei, L., Wasilewski, E., Chakka, S., Bello, A., Moscarello, M., and Kotra, L. (2013). Novel inhibitors of protein arginine deiminase with potential activity in multiple sclerosis animal model. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(4), 1715-1722.
 152. Yu, Y., and Su, K. (2013). Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical and Cellular Immunology*, 4, 139.
 153. Granger, V., Peyneau, M., Chollet-Martin, S., and de Chaisemartin, L. (2019). Neutrophil extracellular traps in autoimmunity and allergy: Immune complexes at work. *Frontiers in Immunology*, 10, 2824.
 154. Nishi, H., and Mayadas, T. N. (2019). Neutrophils in lupus nephritis. *Current Opinion in*

Rheumatology, 31, 193-200.

155. Merza, M., Hartman, H., Rahman, M., Hwaiz, R., Zhang, E., Renström, E., Luo, L., Mörgelin, M., Regner, S., and Thorlacius, H. (2015). Neutrophil extracellular traps induce trypsin activation, inflammation, and tissue damage in mice with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 149, 1920-1931.e8.
156. Gupta, S., and Kaplan, M. J. (2016). The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 12, 402-413.
157. Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R. L., Barrat, F. J., Banchereau, J., and Pascual, V. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*, 3, 73ra20.
158. Hakkim, A., Fürnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abu Abed, U., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R. E., and Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 9813-9818.
159. Carmona-Rivera, C., Khaznadar, S. S., Shwin, K. W., Irizarry-Caro, J. A., O'Neil, L. J., Liu, Y., Jacobson, K. A., Ombrello, A. K., Stone, D. L., Tsai, W. L., Kastner, D. L., Aksentijevich, I., Kaplan, M. J., and Grayson, P. C. (2019). Deficiency of adenosine deaminase 2 triggers adenosine-mediated NETosis and TNF production in patients with DADA2. *Blood*, 134, 395-406.
160. Van Avondt, K., van der Linden, M., Naccache, P. H., Egan, D. A., and Meyaard, L. (2016). Signal inhibitory receptor on leukocytes-1 limits the formation of neutrophil extracellular traps, but preserves intracellular bacterial killing. *The Journal of Immunology*, 196, 3686-3694.
161. Wong, S. L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A. B., Kahn, C. R., and Wagner, D. D. (2015). Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine*, 21, 815-819 .
162. Knight, J. S., Subramanian, V., O'Dell, A. A., Yalavarthi, S., Zhao, W., Smith, C. K., Hodgins, J. B., Thompson, P. R., and Kaplan, M. J. (2015). Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin, and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74, 2199-2206
163. Zavada, J., Pesickova, S., Rysava, R., Olejarova, M., Horák, P., Hrnčíř, Z., Rychlík, I., Havrda, M., Vítová, J., Lukác, J., Rovensky, J., Tegzova, D., Böhmova, J., Zadrazil, J., Hána, J., Dostál, C., and Tesar, V. (2010). Cyclosporine A or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis: the Cyclofa-Lune study. *Lupus*, 19, 1281-1289.
164. Lee, Y. H., Lee, H. S., Choi, S. J., Dai Ji, J. and Song, G. G. (2011). Efficacy and safety of tacrolimus therapy for lupus nephritis: a systematic review of clinical trials. *Lupus* 20, 636-640
165. Cedervall, J., Zhang, Y., Huang, H., Zhang, L., Femel, J., Dimberg, A., and Olsson, A.-K.

- (2015). Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals. *Cancer Research*, 75, 2653-2662.
166. Sayah, D. M., Mallavia, B., Liu, F., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., DerHovanessian, A., Ross, D. J., Lynch 3rd, J. P., Saggarr, R., Ardehali, A.; Lung Transplant Outcomes Group Investigators; Ware, L. B., Christie, J. D., Belperio, J. A., and Looney, M. R. (2015). Neutrophil extracellular traps are pathogenic in primary graft dysfunction after lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191, 455-463.
 167. Davis-Jr, J. C., Manzi, S., Yarboro, C., Rairie, J., McInnes, I., Averbethlyi, D., Sinicropi, D., Hale, V. G., Balow, J., Austin, H., Boumpas, D. T., and Klippel, J. H. (1999). Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus*, 8, 68-76.
 168. Al-Mayouf, S. M., Sunker, A., Abdwani, R., Al Arawi, S., Almurshedi, F., Alhashmi, N., Al Sonbul, A., Sewairi, W., Qari, A., Abdallah, E., Al-Owain, M., Al Motywee, S., Al-Rayes, H., Hashem, M., Khalak, H., Al-Jebali, L., and Alkuraya, F. S. (2011). Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics*, 43, 1186-1188.
 169. Lood, C., Blanco, L. P., Purmalek, M. M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S. S., Smith, C. K., Malech, H. L., Ledbetter, J. A., Elkon, K. B., and Kaplan, M. J. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine*, 22, 146-153.
 170. Fortner, K. A., Blanco, L. P., Buskiewicz, I., Huang, N., Gibson, P. C., Cook, D. L., Pedersen, H. L., Yuen, P. S. T., Murphy, M. P., Perl, A., Kaplan, M. J., and Budd, R. C. (2020). Targeting mitochondrial oxidative stress with MitoQ reduces NET formation and kidney disease in lupus-prone MRL-lpr mice. *Lupus Science and Medicine*, 7, e000387.
 171. Zheng, W., Warner, R., Ruggeri, R., Su, C., Cortes, C., Skoura, A., Ward, J., Ahn, K., Kalgutkar, A., Sun, D., Maurer, T. S., Bonin, P. D., Okerberg, C., Bobrowski, W., Kawabe, T., Zhang, Y., Coskran, T., Bell, S., Kapoor, B., Johnson, K., and Buckbinder, L. (2015). PF-1355, a mechanism-based myeloperoxidase inhibitor, prevents immune complex vasculitis and anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353, 288-298.
 172. Shishikura, K., Horiuchi, T., Sakata, N., Trinh, D.-A., Shirakawa, R., Kimura, T., Asada, Y., and Horiuchi, H. (2016). Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. *British Journal of Pharmacology*, 173, 319-331.
 173. Taylor, P. C., Peters, A. M., Paleolog, E., Chapman, P. T., Elliott, M. J., McCloskey, R., Feldmann, M., and Maini, R. N. (2000). Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 43, 38-47.
 174. Silfvast-Kaiser, A., Paek, S. Y., and Menter, A. (2019). Anti-IL17 therapies for psoriasis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 19, 45-54.

175. Campbell, I. K., Leong, D., Edwards, K. M., Rayzman, V., Ng, M., Goldberg, G. L., Wilson, N. J., Scalzo-Inguanti, K., Mackenzie-Kludas, C., Lawlor, K. E., Wicks, I. P., Brown, L. E., Baz Morelli, A., Panousis, C., Wilson, M. J., Nash, A. D., McKenzie, B. S., and Andrews, A. E. (2016). Therapeutic targeting of the G-CSF receptor reduces neutrophil trafficking and joint inflammation in antibody-mediated inflammatory arthritis. *Journal of Immunology*, 197, 4392-4402.
176. De-Soyza, A., Pavord, I., Elborn, J. S., Smith, D., Wray, H., Puu, M., Larsson, B., and Stockley, R. (2015). A randomised, placebo-controlled study of the CXCR2 antagonist AZD5069 in bronchiectasis. *European Respiratory Journal*, 46, 1021-1032.
177. Gupta, A. K., Giaglis, S., Hasler, P., and Hahn, S. (2014). Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *PLoS One*, 9(5), e97088.
178. Mutua, V., and Gershwin, L. J., (2021). A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: Potential Anti-NETs therapeutics. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 61(2), 194-211.
179. Littlejohn, E. A., and Monrad, S. U. (2018). Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 45(2), 237-255.
180. Malmstrom, V., Catrina, A. I., and Klareskog, L. (2017). The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nature Reviews Immunology*, 17, 60-75.
181. Crowson, C. S., Matteson, E. L., Myasoedova, E., Michet, C. J., Ernste, F. C., Warrington, K. J., Davis, J. M. 3rd, Hunder, G. G., Therneau, T. M., and Gabriel, S. E. (2011). The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis and Rheumatism*, 63(3), 633-639.
182. Alamanos, Y., and Drosos, A. A. (2005). Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 4(3), 130-136.
183. Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., Graham, R. R., Manoharan, A., Ortmann, W., Bhangale, T., Denny, J. C., Carroll, R. J., Eyler, A. E., Greenberg, J. D., Kremer, J. M., Pappas, D. A., Jiang, L., Yin, J., Ye, L., Su, D.-F., Yang, J., Xie, G., Keystone, E., Westra, H.-J., Esko, T., Metspalu, A., Zhou, X., Gupta, N., Mirel, D., Stahl, E. A., Diogo, D., Cui, J., Liao, K., Guo, M., Myouzen, K., Kawaguchi, T., Coenen, M. J. H., van Riel, P. L. C. M., van de Laar, M. A. F. J., Guchelaar, H.-J., Huizinga, T. W. J., Dieudé, P., Mariette, X., Bridges, S. L. Jr., Zhernakova, A., Toes, R. E. M., Tak, P. P., Miceli-Richard, C., Bang, S.-Y., Lee, H.-S., Martin, J., Gonzalez-Gay, M. A., Rodriguez-Rodriguez, L., Rantapää-Dahlqvist, S., Arlestig, L., Choi, H. K., Kamatani, Y., Galan, P., Lathrop, M., RACI consortium, GARNET consortium, Eyre, S., Bowes, J., Barton, A., de Vries, N., Moreland, L. W., Criswell, L. A., Karlson, E. W., Taniguchi, A., Yamada, R., Kubo, M., Liu, J. S., Bae, S.-C., Worthington, J., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Raychaudhuri, S., Stranger, B. E., De Jager, P. L., Franke, L., Visscher, P. M., Brown, M. A., Yamanaka, H., Mimori, T., Takahashi, A., Xu, H., Behrens, T. W., Siminovitch, K. A., Momohara, S., Matsuda, F., Yamamoto, K., and Plenge, R. M. (2014). Genetics of rheumatoid arthritis

contributes to biology and drug discovery. *Nature*, 506(7488), 376-381.

184. Carlton, V. E. H., Honigberg, L. A., Schrodi, S. J., Chokkalingam, A. P., Alexander, H. C., Ardlie, K. G., Huang, Q., Smith, A. M., Spoerke, J. M., Conn, M. T., Chang, M., Chang, S.-Y. P., Saiki, R. K., Catanese, J. J., Leong, D. U., Garcia, V. E., McAllister, L. B., Jeffery, D. A., Lee, A. T., Batliwalla, F., Remmers, E., Criswell, L. A., Seldin, M. F., Kastner, D. L., Amos, C. I., Sninsky, J. J., and Gregersen, P. K. (2004). A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *The American Journal of Human Genetics*, 75(2), 330-337.
185. Costenbader, K. H., Feskanich, D., Mandl, L. A., and Karlson, E. W. (2006). Smoking Intensity, Duration, and Cessation, and the Risk of Rheumatoid Arthritis in Women. *The American Journal of Medicine*, 119(6), 503.e1-503.e9.
186. Qin, B., Yang, M., Fu, H., Ma, N., Wei, T., Tang, Q., Hu, Z., Liang, Y., Yang, Z., and Zhong, R. (2015). Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Arthritis Research and Therapy*, 17(1), 86.
187. Pratesi, F., Tommasi, C., Anzilotti, C., Chimenti, D., and Migliorini, P. (2006). Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(3), 733-741.
188. Hochberg, M. C., Gravallese, E. M., Smole, J. S., van der Heijde, D., Weinblatt, M. E., and Weisman, M. H. (2023). *Rheumatology*. (Eighth edition). Philadelphia: Elsevier, 749-777.
189. Smolen, J. S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G. R., Emery, P., Firestein, G. S., Kavanaugh, A., McInnes, I. B., Solomon, D. H., Strand, V., and Yamamoto, K. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18001.
190. Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O. III, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M. W., Hobbs, K., Huizinga, T. W. J., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T. K., Laing, T., Mease, P., Ménard, H. A., Moreland, L. W., Naden, R. L., Pincus, T., Smolen, J. S., Stanislawski-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P. P., Upchurch, K. S., Vencovský, J., Wolfe, F., and Hawker, G. (2010). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American college of rheumatology/european league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), 2569-2581.
191. Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A.-K., Nicholas, A. P., Zendman, A. J., Eklund, A., Catrina, A. I., and Klareskog, L. (2008). Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67, 1488-1492.
192. Giles, J. T., Fert-Bober, J., Park, J. K., Bingham, C. O., Andrade, F., Fox-Talbot, K., Zilliox, M. J., Halushka, M. K., Bathon, J. M., and Robinson, W. H. (2012). Myocardial citrullination in rheumatoid arthritis: A correlative histopathologic study. *Arthritis Research and Therapy*, 14(1), R39.
193. Kinloch, A., Lundberg, K., Wait, R., Wegner, N., Lim, N. H., Zendman, A. J., Saxne, T.,

- Malmström, V., and Venables, P. J. (2008). Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58(8), 2287-2295.
194. Seri, Y., Shoda, H., Suzuki, A., Matsumoto, R., Sakurai, K., Nakamura, T., Fujio, K., and Yamamoto, K. (2015). Peptidylarginine deiminase type 4 deficiency reduced arthritis severity in a glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis model. *Scientific Reports*, 5, 13041.
 195. Holers, V. M. (2013). Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Immunology*, 25, 728-735.
 196. Arend, W. P., and Firestein, G. S. (2012). Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8, 573-586.
 197. Steiner, G. (2007). Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 32, 23-36.
 198. Bartok, B., and Firestein, G. S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*, 233, 233-255.
 199. Ziff, M. (1974). Relation of cellular infiltration of rheumatoid synovial membrane to its immune response. *Arthritis and Rheumatism*, 17, 313-319.
 200. Orr, C., Vieira-Sousa, E., Boyle, D. L., Buch, M. H., Buckley, C. D., Cañete, J. D., Catrina, A. I., Choy, E. H. S., Emery, P., Fearon, U., Filer, A., Gerlag, D., Humby, F., Isaacs, J. D., Just, S. A., Lauwerys, B. R., Le Goff, B., Manzo, A., McGarry, T., McInnes, I. B., Najm, A., Pitzalis, C., Pratt, A., Smith, M., Tak, P. P., Thurlings, R., Fonseca, J. E., Veale, D. J., and Tas, S. W. (2017). Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nature Reviews Rheumatology*, 13, 463-475.
 201. Keyszer, G., Redlich, A., Häupl, T., Zacher, J., Sparmann, M., Ungethüm, U., Gay, S., and Burmester, G. R. (1998). Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis and Rheumatism*, 41, 1378-1387.
 202. Schett, G., and Gravallese, E. (2012). Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis, and treatment. *Nature Reviews Rheumatology*, 8, 656-664.
 203. Redlich, K., and Smolen, J. S. (2012). Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, 234-250.
 204. Harre, U., Georgess, D., Bang, H., Bozec, A., Axmann, R., Ossipova, E., Jakobsson, P.-J., Baum, W., Nimmerjahn, F., Szarka, E., Sarmay, G., Krumbholz, G., Neumann, E., Toes, R., Scherer, H.-U., Catrina, A. I., Klareskog, L., Jurdic, P., and Schett, G. (2012). Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *Journal of Clinical Investigation*, 122, 1791-1802.
 205. Nakano, S., Morimoto, S., Suzuki, S., Tsushima, H., Yamanaka, K., Sekigawa, I., and

- Takasaki, Y. (2015). Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 54, 1498-1506.
206. Genovese, M. C., Kremer, J., Zamani, O., Ludivico, C., Krogulec, M., Xie, L., Beattie, S. D., Koch, A. E., Cardillo, T. E., Rooney, T. P., Macias, W. L., de Bono, S., Schlichting, D. E., and Smolen, J. S. (2016). Baricitinib in patients with refractory rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 374, 1243-1252.
 207. Pillinger, M. H., and Abramson, S. B. (1995). The neutrophil in rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 21, 691-714.
 208. Pratesi, F., Dioni, I., Tommasi, C., Alcaro, M. C., Paolini, I., Barbetti, F., Boscaro, F., Panza, F., Puxeddu, I., Rovero, P., and Migliorini, P. (2014). Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophil extracellular traps. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(7), 1414-1422.
 209. Spengler, J., Lugonja, B., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., Creese, A. J., Pearson, M. J., Grant, M. M., Milward, M., Lundberg, K., Buckley, C. D., Filer, A., Raza, K., Cooper, P. R., Chapple, I. L., and Scheel-Toellner, D. (2015). Release of active peptidyl arginine deiminases by neutrophils can explain production of extracellular citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis and Rheumatology*, 67(12), 3135-3145.
 210. Dwivedi, N., Neeli, I., Schall, N., Wan, H., Desiderio, D. M., Csernok, E., Thompson, P. R., Dali, H., Briand, J.-P., Muller, S., and Radic, M. (2014). Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity. *The FASEB Journal*, 28(7), 2840-2851.
 211. Sohn, D. H., Rhodes, C., Onuma, K., Zhao, X., Sharpe, O., Gazitt, T., Shiao, R., Fert-Bober, J., Cheng, D., Lahey, L. J., Wong, H. H., Van Eyk, J., Robinson, W. H., and Sokolove, J. (2015). Local joint inflammation and histone citrullination in a murine model of the transition from preclinical autoimmunity to inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 67(11), 2877-2887.
 212. O'Neil, L. J., Barrera-Vargas, A., Sandoval-Heglund, D., Merayo-Chalico, J., Aguirre-Aguilar, E., Aponte, A. M., Ruiz-Perdomo, Y., Gucek, M., El-Gabalawy, H., Fox, D. A., Katz, J. D., Kaplan, M. J., and Carmona-Rivera, C. (2020). Neutrophil-mediated carbamylation promotes articular damage in rheumatoid arthritis. *Science Advances*, 6(44), eabd2688.
 213. Carmona-Rivera, C., Carlucci, P. M., Goel, R. R., James, E., Brooks, S. R., Rims, C., Hoffmann, V., Fox, D. A., Buckner, J. H., and Kaplan, M. J. (2020). Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 130(13), e139388.
 214. Corsiero, E., Pratesi, F., Prediletto, E., Bombardieri, M., and Migliorini, P. (2016). NETosis as source of autoantigens in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*, 7, 485.
 215. Carmona-Rivera, C., Carlucci, P. M., Moore, E., Lingampalli, N., Uchtenhagen, H., James,

- E., Liu, Y., Bicker, K. L., Wahamata, H., Hoffmann, V., Catrina, A. I., Thompson, P. R., Buckner, J. H., Robinson, W. H., Fox, D. A., and Kaplan, M. J. (2017). Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Science Immunology*, 2(10), eaag3358.
216. Kahlenberg, J. M., Carmona-Rivera, C., Smith, C. K., and Kaplan, M. J. (2013). Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *Journal of Immunology*, 190(3), 1217-1226.
 217. Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., Bassett, R., Amuro, H., Fukuhara, S., Ito, T., Liu, Y. J., and Gilliet, M. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*, 3(73), 73ra19.
 218. Scarpa, R., Ayala, F., Caporaso, N., and Olivieri, I. (2006). Psoriasis, psoriatic arthritis, or psoriatic disease? *Journal of Rheumatology*, 33(2), 210-212.
 219. Ritchlin, C. T., Colbert, R. A., and Gladman, D. D. (2017). Psoriatic arthritis. *New England Journal of Medicine*, 376, 2095-2096.
 220. Gladman, D. D. (1995). Criteria for psoriatic arthritis. *Baillieres Clinical Rheumatology*, 9(2), 319-329.
 221. Ogdie, A., Langan, S., Love, T., Haynes, K., Shin, D., Seminara, N., Mehta, N. N., Troxel, A., Choi, H., and Gelfand, J. M. (2013). Prevalence and treatment patterns of psoriatic arthritis in the UK. *Rheumatology*, 52, 568-575.
 222. Kaufman, B. P., and Alexis, A. F. (2018). Psoriasis in skin of color: Insights into the epidemiology, clinical presentation, genetics, quality-of-life impact, and treatment of psoriasis in non-white racial/ethnic groups. *American Journal of Clinical Dermatology*, 19, 405-423.
 223. Winchester, R., Minevich, G., Steshenko, V., Kirby, B., Kane, D., Greenberg, D. A., and FitzGerald, O. (2012). HLA associations reveal genetic heterogeneity in psoriatic arthritis and in the psoriasis phenotype. *Arthritis and Rheumatism*, 64, 1134-1144.
 224. O'Rielly, D. D., Jani, M., Rahman, P., and Elder, J. (2019). The genetics of psoriasis and psoriatic arthritis. *Journal of Rheumatology Supplement*, 95, 46-50.
 225. Scher, J. U., Ogdie, A., Merola, J. F., and Ritchlin, C. (2019). Preventing psoriatic arthritis: focusing on patients with psoriasis at increased risk of transition. *Nature Reviews Rheumatology*, 15, 153-166.
 226. Solmaz, D., Eder, L., and Aydin, S. Z. (2018). Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of psoriatic arthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 32(2), 295-311.
 227. Bowes, J., Budu-Aggrey, A., Huffmeier, U., Uebe, S., Steel, K., Hebert, H. L., Wallace, C., Massey, J., Bruce, I. N., Bluett, J., Feletar, M., Morgan, A. W., Marzo-Ortega, H.,

- Donohoe, G., Morris, D. W., Helliwell, P., Ryan, A. W., Kane, D., Warren, R. B., Korendowych, E., Alenius, G., Giardina, E., Packham, J., McManus, R., FitzGerald, O., McHugh, N., Brown, M. A., Ho, P., Behrens, F., Burkhardt, H., Reis, A., and Barton, A. (2015). Dense genotyping of immune-related susceptibility loci reveals new insights into the genetics of psoriatic arthritis. *Nature Communications*, 6, 7741.
228. Thorarensen, S. M., Lu, N., Ogdie, A., Gelfand, J. M., Choi, H. K., and Love, T. J. (2017). Physical trauma recorded in primary care is associated with the onset of psoriatic arthritis among patients with psoriasis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76, 521-525.
229. FitzGerald, O., Haroon, M., Giles, J. T., and Winchester, R. (2015). Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. *Arthritis Research and Therapy*, 17, 115.
230. Kishimoto, M., Deshpande, G. A., Fukuoka, K., Kawakami, T., Ikegaya, N., Kawashima, S., Komagata, Y., and Kaname, S. (2021). Clinical features of psoriatic arthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, 35(2), 101670.
231. Bonifati, C., Elia, F., Francesconi, F., Ceralli, F., Izzi, S., Solivetti, F. M., and De Mutiis, C. (2012). The diagnosis of early psoriatic arthritis in an outpatient dermatological centre for psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26, 627-633.
232. McArdle, A., Pennington, S., and FitzGerald, O. (2018). Clinical features of psoriatic arthritis: A comprehensive review of unmet clinical needs. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 55, 271-294.
233. Hochberg, M. C., Gravalles, E. M., Silman, A. J., Smolen, J. S., Weinblatt, M. E., and Weisman M. H. (2015). *Rheumatology*. Sixth Edition. Philadelphia : Elsevier Limited, 1051-1059.
234. Gordon, K. B., Ruderman E. M. (2005) *Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathophysiology, Therapeutic Intervention, and Complementary Medicine*, Berlin Heidelberg: Springer, 76-79.
235. Peluso, R., Iervolino, S., Vitiello, M., Bruner, V., Lupoli, G., and Di Minno, M. N. D. (2015). Extra-articular manifestations in psoriatic arthritis patients. *Clinical Rheumatology*, 34(4), 745-753.
236. Adebajo, A., Boehncke, W., Gladman, D. D., and Mease P. J. (2016) *Psoriatic Arthritis and Psoriasis_ Pathology and Clinical Aspects*. Switzerland: Springer International Publishing, 61-70.
237. Taylor, W., Gladman, D., Helliwell, P., Marchesoni, A., Mease, P., Mielants, H., and CASPAR Study Group. (2006). Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis and Rheumatism*, 54, 2665.
238. Fearon, U., Reece, R., Smith, J., Emery, P., and Veale, D. J. (1999). Synovial cytokine and growth factor regulation of MMPs/TIMPs: implications for erosions and angiogenesis in early rheumatoid and psoriatic arthritis patients. *Annals of the New York Academy of*

Sciences, 878, 619-621.

239. Fearon, U., Griposios, K., Fraser, A., Reece, R., Emery, P., Jones, P. F., and Veale, D. J. (2003). Angiopoietins, growth factors, and vascular morphology in early arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 30(2), 260-268.
240. Cañete, J. D., Santiago, B., Cantaert, T., Sanmartí, R., Palacin, A., Celis, R., Graell, E., Gil-Torregrosa, B., Baeten, D., and Pablos, J. L. (2007). Ectopic lymphoid neogenesis in psoriatic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66(6), 720-726.
241. van Kuijk, A. W. R., Reinders-Blankert, P., Smeets, T. J. M., Dijkmans, B. A. C., and Tak, P. P. (2006). Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and joint destruction in the synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65, 1551-1557.
242. Mak, R. K. H., Hundhausen, C., and Nestle, F. O. (2009). Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis: clinical subtypes, histological features and associated comorbidities. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 100 (2), 2-13.
243. Tassioulas, I., Duncan, S. R., Centola, M., Theofilopoulos, A. N., and Boumpas, D. T. (1999). Clonal characteristics of T cell infiltrates in skin and synovium of patients with psoriatic arthritis. *Human Immunology*, 60(6), 479-491.
244. Chang, J. C., Smith, L. R., Froning, K. J., Schwabe, B. J., Laxer, J. A., Caralli, L. L., Kurkland, H. H., Karasek, M. A., Wilkinson, D. I., and Carlo, D. J. (1995). CD8+ T-cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptors V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 756, 370-381.
245. Kirkham, B. W., Kavanaugh, A., and Reich, K. (2014). Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis. *Immunology*, 141, 133-142.
246. Reich, K., Papp, K. A., Matheson, R. T., Tu, J. H., Bissonnette, R., Bourcier, M., Gratton, D., Kunyetz, R. A., Poulin, Y., Rosoph, L. A., Stingl, G., Bauer, W. M., Salter, J. M., Falk, T. M., Blödorn-Schlicht, N. A., Hueber, W., Sommer, U., Schumacher, M. M., Peters, T., Kriehuber, E., Lee, D. M., Wiczorek, G. A., Kolbinger, F., and Bleul, C. C. (2015). Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Experimental Dermatology*, 24(7), 529-535.
247. Keijsers, R. R. M. C., Joosten, I., van Erp, P. E. J., Koenen, H. J. P. M., and van de Kerkhof, P. C. M. (2014). Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Experimental Dermatology*, 23(11), 799-803.
248. McGonagle, D. G., McInnes, I. B., Kirkham, B. W., and Sherlock, J. (2019). The role of IL-17A in axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis: recent advances and controversies. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(9), 1167-1178.
249. Menon, B., Gullick, N. J., Walter, G. J., Rajasekhar, M., Garrood, T., Evans, H. G., Taams, L. S., and Kirkham, B. W. (2014). Interleukin-17+ CD8+ T cells are enriched in the joints of patients with psoriatic arthritis and correlate with disease activity and joint damage

progression. *Arthritis and Rheumatology*, 66(5), 1272-1281.

250. Raychaudhuri, S. P., Raychaudhuri, S. K., and Genovese, M. C. (2012). IL-17 receptor and its functional significance in psoriatic arthritis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 359(1-2), 419-429.
251. Veale, D. J., and Fearon, U. (2018). The pathogenesis of psoriatic arthritis. *The Lancet*, 391, 2273-2284.
252. Nograles, L. C., Zaba, L. C., Guttman-Yassky, E., Fuentes-Duculan, J., Suárez-Fariñas, M., Cardinale, A., Khatcherian, J., Gonzalez, K. C., Pierson, T. R., White, C., Pensabene, I., Coats, I., Novitskaya, M. A., Lowes, J. G., and Krueger, J. (2008). Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *British Journal of Dermatology*, 159(5), 1092-1102.
253. Girolomoni, G., Mrowietz, U., and Paul, C. (2012). Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17. *British Journal of Dermatology*, 167(4), 717-724.
254. Gutowska-Owsiak, D., Schaupp, A. L., Salimi, M., Selvakumar, T. A., McPherson, T., Taylor, S., and Ogg, G. S. (2012). IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Experimental Dermatology*, 21(2), 104-110.
255. Koenders, M. I., Lubberts, E., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Helsen, M. M., Di Padova, F. E., Boots, A. M. H., Gram, H., Joosten, L. A. B., and van den Berg, W. B. (2005). Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *The American Journal of Pathology*, 167(1), 141-149.
256. Mease, P. J., McInnes, I. B., Kirkham, B., Kavanaugh, A., Rahman, P., van der Heijde, D., Landewé, R., Nash, P., Pricop, L., Yuan, J., Richards, H. B., and Mpofu, S.; FUTURE 1 Study Group. (2015). Secukinumab inhibition of interleukin-17A in patients with psoriatic arthritis. *New England Journal of Medicine*, 373, 1329-1339.
257. McInnes, I. B., Mease, P. J., Kirkham, B., Kavanaugh, A., Ritchlin, C. T., Rahman, P., van der Heijde, D., Landewé, R., Conaghan, P. G., Gottlieb, A. B., Richards, H., Pricop, L., Ligozio, G., Patekar, M., and Mpofu, S.; FUTURE 2 Study Group. (2015). Secukinumab, a human antiinterleukin-17A monoclonal antibody, in patients with psoriatic arthritis (FUTURE 2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 386, 1137-1146.
258. Mease, P. J., van der Heijde, D., Ritchlin, C. T., Okada, M., Cuchacovich, R. S., Shuler, C. L., Lin, C.-Y., Braun, D. K., Lee, C. H., and Gladman, D. D.; SPIRIT-P1 Study Group. (2017). Ixekizumab, an interleukin-17A specific monoclonal antibody, for the treatment of biologic-naïve patients with active psoriatic arthritis: results from the 24-week randomised, double-blind, placebo-controlled and active (adalimumab)-controlled period of the phase III trial SPIRIT-P1. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76, 79-87.
259. Ritchlin, C. T., and Krueger, J. G. (2016). New therapies for psoriasis and psoriatic arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 28, 204-210.

260. Lee, E., Trepicchio, W. L., Oestreicher, J. L., Pittman, D., Wang, F., Chamian, F., Dhodapkar, M., and Krueger, J. G. (2004). Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(1), 125-130.
261. Benham, H., Norris, P., Goodall, J., Wechalekar, M. D., FitzGerald, O., Szentpetery, A., Smith, M., Thomas, R., and Gaston, H. (2013). Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Research and Therapy*, 15(5), R136.
262. Mitra, A., Raychaudhuri, S. K., and Raychaudhuri, S. P. (2012). Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 14, R65.
263. Fujita, H. (2012). Role of IL-22 in the pathogenesis of skin diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 35, 168-175.
264. Ma, H.-L., Liang, S., Li, J., Napierata, L., Brown, T., Benoit, S., Senices, M., Gill, D., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Nickerson-Nutter, C., Fouser, L. A., and Young, D. A. (2008). IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 118(2), 597-607.
265. Rutz, S., Eidenschenk, C., and Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological Reviews*, 252, 116-132.
266. Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: A potential role in psoriasis. *European Journal of Immunology*, 36, 1309-1323.
267. Ciccia, F., Guggino, G., Ferrante, A., Raimondo, S., Bignone, R., Rodolico, V., Peralta, S., Van Tok, M., Cannizzaro, A., Schinocca, C., Ruscitti, P., Cipriani, P., Giacomelli, R., Alessandro, R., Dieli, F., Rizzo, A., Baeten, D., and Triolo, G. (2016). Interleukin-9 overexpression and Th9 polarization characterize the inflamed gut, the synovial tissue, and the peripheral blood of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 68, 1922-1931.
268. Nowak, E. C., Weaver, C. T., Turner, H., Begum-Haque, S., Becher, B., Schreiner, B., Coyle, A. J., Kasper, L. H., and Noelle, R. J. (2009). IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 1653-1660.
269. Elyaman, W., Bradshaw, E. M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renauld, J.-C., Kuchroo, V. K., and Khoury, S. J. (2009). IL-9 induces differentiation of Th17 cells and enhances function of FoxP3⁺ natural regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12885-12890.
270. Raychaudhuri, S. K., Abria, C., and Raychaudhuri, S. P. (2017). Functional significance of interleukin-9 and its receptor system in the pathogenesis of psoriatic arthritis: comment on the article by Ciccia et al. *Arthritis and Rheumatology*, 69, 472-473.

271. Veale, D. J., Barnes, L., Rogers, S., and FitzGerald, O. (1994). Immunohistochemical markers for arthritis in psoriasis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 53, 450-454.
272. Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P., and Bottomly, K. (1995). B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4⁺ T cells to protein antigens in vivo. *Journal of Immunology*, 155, 3734-3741.
273. Armas-González, E., Díaz-Martín, A., Domínguez-Luis, M. J., Arce-Franco, M. T., Herrera-García, A., Hernández-Hernández, M. V., Bustabad, S., Usategui, A., Pablos, J. L., Cañete, J. D., and Díaz-González, F. (2015). Differential antigen-presenting B cell phenotypes from synovial microenvironment of patients with rheumatoid and psoriatic arthritis. *Journal of Rheumatology*, 42(10), 1825-1834.
274. Jongbloed, S. L., Lebre, M. C., Fraser, A. R., Gracie, J. A., Sturrock, R. D., Tak, P. P., and McInnes, I. B. (2006). Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 8(1), R15.
275. Candia, L., Marquez, J., Hernandez, C., Zea, A. H., and Espinoza, L. R. (2007). Toll-like receptor-2 expression is upregulated in antigen-presenting cells from patients with psoriatic arthritis: a pathogenic role for innate immunity? *Journal of Rheumatology*, 34, 374-379.
276. Kurowska-Stolarska, M., and Alivernini, S. (2017). Synovial tissue macrophages: friend or foe? *Rheumatic and musculoskeletal diseases*, 3(2), e000527.
277. Aochi, S., Tsuji, K., Sakaguchi, M., Huh, N., Tsuda, T., Yamanishi, K., Komine, M., and Iwatsuki, K. (2011). Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64(5), 879-887.
278. Kopp, T., Kieffer, J. D., Rot, A., Strommer, S., Stingl, G., and Kupper, T. S. (2001). Inflammatory skin disease in K14/p40 transgenic mice: evidence for interleukin-12-like activities of p40. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(3), 618-626.
279. Raychaudhuri, S. P., Mitra, A., Mitra, D. A., Abria, C., and Raychaudhuri, S. K. (2014). Th9 cells in inflammatory cascades of autoimmune arthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 66(11), S708 (Abstract 1602).
280. Sherlock, J. P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S. P., Chao, C.-C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D. M., Bowman, E. P., McClanahan, T. K., Yearley, J. H., Eberl, G., Buckley, C. D., Kastelein, R. A., Pierce, R. H., Laface, D. M., and Cua, D. J. (2012). IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR-gammat⁺ CD3⁺ CD4⁺CD8⁻ enthesal resident T cells. *Nature Medicine*, 18(7), 1069-1076.
281. Bravo, A., and Kavanaugh, A. (2019). Bedside to bench: defining the immunopathogenesis of psoriatic arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 15(11), 645-656.
282. Ettehadi, P., Greaves, M. W., Wallach, D., Aderka, D., and Camp, R. D. (1994). Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha) biological activity in psoriatic skin lesions.

Clinical & Experimental Immunology, 96(1), 146-151.

283. Banno, T., Gazel, A., and Blumenberg, M. (2004). Effects of tumor necrosis factor- α (TNF α) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32633-32642.
284. Fitzgerald, O., and Winchester, R. (2009). Psoriatic arthritis: from pathogenesis to therapy. *Arthritis Research and Therapy*, 11(1), 214.
285. Weitz, J. E., and Ritchlin, C. T. (2013). Mechanistic insights from animal models of psoriasis and psoriatic arthritis. *Current Rheumatology Reports*, 15(11), 377.
286. Lin, S.-H., Ho, J.-C., Li, S.-C., Cheng, Y.-W., Hsu, C.-Y., Chou, W.-Y., Hsiao, C.-C., and Lee, C.-H. (2022). TNF- α activating osteoclasts in patients with psoriatic arthritis enhances the recruitment of osteoclast precursors: A plausible role of WNT5A-MCP-1 in osteoclast engagement in psoriatic arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 921.
287. Keystone, E. C., Genovese, M. C., Klareskog, L., Hsia, E. C., Hall, S. T., Miranda, P. C., Pazdur, J., Bae, S.-C., Palmer, W., Zrubek, J., Wiekowski, M., Visvanathan, S., Wu, Z., and Rahman, M. U. (2009). Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor α given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: the GO-FORWARD Study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68, 789-796.
288. Antoni, C., Krueger, G. G., de Vlam, K., Birbara, C., Beutler, A., Guzzo, C., Zhou, B., Dooley, L. T., and Kavanaugh, A.; IMPACT 2 Trial Investigators. (2005). Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of the IMPACT2 trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64, 1150-1157.
289. Mease, P. J. (2005). Adalimumab: an anti-TNF agent for the treatment of psoriatic arthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5, 1491-1504.
290. Kavanaugh, A., McInnes, I., Mease, P., Krueger, G. G., Gladman, D., Gomez-Reino, J., Papp, K., Zrubek, J., Mudivarthy, S., Mack, M., Visvanathan, S., and Beutler, A. (2009). Golimumab, a new human tumor necrosis factor α antibody, administered every four weeks as a subcutaneous injection in psoriatic arthritis: twenty-four-week efficacy and safety results of a randomized, placebo-controlled study. *Arthritis and Rheumatism*, 60, 976-986.
291. Mease, P. J., Fleischmann, R., Deodhar, A. A., Wollenhaupt, J., Khraishi, M., Kielar, D., Woltering, F., Stach, C., Hoepken, B., Arledge, T., and van der Heijde, D. (2014). Effect of certolizumab pegol on signs and symptoms in patients with psoriatic arthritis: 24-week results of a Phase 3 double-blind randomized placebo-controlled study (RAPID-PsA). *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73, 48-55.
292. Kim, G. M., Park, H., and Lee, S. Y. (2022). Roles of osteoclast-associated receptor in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 89(5), 105400.
293. Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y. J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through

interferon-alpha production. *Journal of Experimental Medicine*, 202(1), 135-143.

294. Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.-M., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449(7162), 564-569.
295. Zaba, L. C., Cardinale, I., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Novitskaya, I., Khatcherian, A., Bluth, M. J., Lowes, M. A., and Krueger, J. G. (2007). Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *Journal of Experimental Medicine*, 204(13), 3183-3194.
296. Li, N., Yamasaki, K., Saito, R., Fukushi-Takahashi, S., Shimada-Omori, R., Asano, M., and Aiba, S. (2014). Alarmin function of cathelicidin antimicrobial peptide LL37 through IL-36gamma induction in human epidermal keratinocytes. *Journal of Immunology*, 193, 5140-5148.
297. Tan, A. L., Benjamin, M., Toumi, H., Grainger, A. J., Tanner, S. F., Emery, P., and McGonagle, D. (2007). The relationship between the extensor tendon enthesis and the nail in distal interphalangeal joint disease in psoriatic arthritis-a high-resolution MRI and histological study. *Rheumatology*, 46, 253-256.
298. Riol-Blanco, L., Ordoñas-Montanes, J., Perro, M., Naval, E., Thiriot, A., Alvarez, D., Paust, S., Wood, J. N., and von Andrian, U. H. (2014). Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature*, 510, 157-161.
299. Greb, J. E., Goldminz, A. M., Elder, J. T., Lebwohl, M. G., Gladman, D. D., Wu, J. J., Mehta, N. N., Finlay, A. Y., and Gottlieb, A. B. (2016). Psoriasis. *Nature Reviews Disease Primer*, 2, 16082.
300. Li, B., Li, G., Yang, X., Song, Z., Wang, Y., and Zhang, Z. (2022). NETosis in psoriatic arthritis: serum MPO-DNA complex level correlates with its disease activity. *Frontiers in Immunology*, 13, 911347.
301. Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M. B., Yalavarthi, S., Villanueva, E. C., Shah, P., Kaplan, M. J., and Bruce, A. T. (2011). Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *Journal of Immunology*, 187(1), 490-500.
302. Katayama, H. (2018). Development of psoriasis by continuous neutrophil infiltration into the epidermis. *Experimental Dermatology*, 27, 1084-1091.
303. Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., and Sospedra, M. (2012). T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *Journal of Immunology*, 188, 3150-3159.
304. Sangaletti, S., Tripodo, C., Chiodoni, C., Guarnotta, C., Cappetti, B., Casalini, P., Piconese, S., Parenza, M., Guiducci, C., Vitali, C., and Colombo, M. P. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic

cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood*, 120, 3007-3018.

305. Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*, 7, 545-594.
306. Hancock, R. E. W., and Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
307. Smet, D. K., and Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*, 27(18), 1337-1347.
308. Sørensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., and Borregaard, N. (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97(12), 3951-3959.
309. Burton, M. F., and Steel, P. G. (2009). The chemistry and biology of LL-37. *The Royal Society of Chemistry*, 26, 1572-1584.
310. Bandurska, K., Berdowska, A., Barczyńska-Felusiak, R., and Krupa, P. (2015). Unique features of human cathelicidin LL-37. *BioFactors*, 41(5), 289-300.
311. Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., and Schoofs, L. (2012). A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunology*, 280, 22-35.
312. Peric, M., Koglin, S., Kim, S. M., Morizane, S., Besch, R., Prinz, J. C., Ruzicka, T., Gallo, R. L., and Schaubert, J. (2008). IL-17A enhances vitamin D3-induced expression of cathelicidin. *Journal of Immunology*, 181(12), 8504-8512.
313. Iimura, M., Gallo, R. L., Hase, K., Miyamoto, Y., Eckmann, L., and Kagnoff, M. F. (2005). Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens. *Journal of Immunology*, 174(8), 4901-4907.
314. Majewski, K., Kozłowska, E., Zelechowska, P., and Brzezińska-Błaszczyk, E. (2018). Serum concentrations of antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 in patients with bacterial lung infections. *Central European Journal of Immunology*, 43, 453-457.
315. Lai, Y., Adhikarakunnathu, S., and Bhardwaj, K. (2011). LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs. *PLoS One*, 6(10), e26632.
316. Into, T., Inomata, M., Shibata, K., and Murakami, Y. (2010). Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3-, and 4-triggered expression of IL-6, IL-8, and CXCL10 in human gingival fibroblasts. *Cellular Immunology*, 264(1), 104-109.
317. Tjabringa, G. S., Ninaber, D. K., Drijfhout, J. W., Rabe, K. F., and Hiemstra, P. S. (2006). Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *International Archives of Allergy and Immunology*, 140(2), 103-112.

318. Tokumaru, S., Sayama, K., Shirakata, Y., Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Hanakawa, Y., Yahata, Y., Dai, X., Tohyama, M., Nagai, H., Yang, L., Higashiyama, S., Yoshimura, A., Sugai, M., and Hashimoto, K. (2005). Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *Journal of Immunology*, 175(7), 4662-4668.
319. Alalwani, S. M., Sierigk, J., Herr, C., Pinkenburg, O., Gallo, R., Vogelmeier, C., and Bals, R. (2010). The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *European Journal of Immunology*, 40(4), 1118-1126.
320. Otte, J.-M., Zdebik, A.-E., and Brand, S. (2009). Effects of the cathelicidin LL-37 on intestinal epithelial barrier integrity. *Regulatory Peptides*, 156, 104-117.
321. Di Nardo, A., Braff, M. H., and Taylor, K. R. (2007). Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *Journal of Immunology*, 178, 1829-1834.
322. Hwang, Y. J., Jung, H. J., Kim, M. J., Roh, N. K., Jung, J. W., Lee, Y. W., Choe, Y. B., and Ahn, K. J. (2014). Serum levels of LL-37 and inflammatory cytokines in plaque and guttate psoriasis. *Hindawi Mediators of Inflammation*, 2014, 268257.
323. Lande, R., Botti, E., Jandus, C., Dojcinovic, D., Fanelli, G., Conrad, C., Chamilos, G., Feldmeyer, L., Marinari, B., Chon, S., Vence, L., Riccieri, V., Guillaume, P., Navarini, A. A., Romero, P., Costanzo, A., Piccolella, E., Gilliet, M., and Frasca, L. (2014). The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nature Communications*, 3(5), 5621.
324. Herster, F., Bittner, Z., Archer, N. K., Dickhöfer, S., Eisel, D., Eigenbrod, T., Knorpp, T., Schneiderhan-Marra, N., Löffler, M. W., Kalbacher, H., Vierbuchen, T., Heine, H., Miller, L. S., Hartl, D., Freund, L., Schäkel, K., Heister, M., Ghoreschi, K., and Weber, A. N. R. (2020). Neutrophil extracellular trap-associated RNA and LL37 enable self-amplifying inflammation in psoriasis. *Nature Communications*, 11(1), 105.
325. Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okumura, K., and Ogawa, H. (2007). Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 594-604.
326. Braff, M. H., Hawkins, M. A., Di Nardo, A., Lopez-Garcia, B., Howell, M. D., Wong, C., Lin, K., Streib, J. E., Dorschner, R., Leung, D. Y. M., and Gallo, R. L. (2005). Structure-function relationships among human cathelicidin peptides: Dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities. *Journal of Immunology*, 174(7), 4271-4278.
327. Frasca, L., Palazzo, R., Chimenti, M. S., Alivernini, S., Tulusso, B., Bui, L., Botti, E., Giunta, A., Bianchi, L., Petricca, L., Auteri, S. E., Spadaro, F., Fonti, G. L., Falchi, M., Evangelista, A., Marinari, B., Pietraforte, I., Spinelli, F. R., Colasanti, T., Alessandri, C., Conti, F., Gremese, E., Costanzo, A., Valesini, G., Perricone, R., and Lande, R. (2018). Anti-LL37 antibodies are present in psoriatic arthritis (PsA) patients: New biomarkers in

PsA. *Frontiers in Immunology*, 9, 1936.

328. Gestermann, N., Di Domizio, J., Lande, R., Demaria, O., Frasca, L., Feldmeyer, L., Di Lucca, J., and Gilliet, M. (2018). Netting neutrophils activate autoreactive B cells in lupus. *Journal of Immunology*, 200, 3364-3371.
329. Lande, R., Palazzo, R., Gestermann, N., Jandus, C., Falchi, M., Spadaro, F., Riccieri, V., James, E. A., Butera, A., Boirivant, M., Feldmeyer, L., Surbeck, I., Di Lucca, J., Stuber, F., Spinelli, F. R., Botti, E., Marinari, B., Bianchi, L., Pica, R., Cerbelli, B., Giannakakis, K., Auteri, S. E., Daniels, I., Durrant, L. G., Horstman, S., Costanzo, A., Romero, P., Alessandri, C., Conti, F., Valesini, G., Gilliet, M., Chizzolini, C., and Frasca, L. (2020). Native/citrullinated LL37-specific T-cells help autoantibody production in Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific Reports*, 10(1), 5851.
330. Kuhns, D. B., Long Priel, D. A., Chu, J., and Zarembek, K. A. (2015). Isolation and functional analysis of human neutrophils. *Current Protocols in Immunology*, 111, 7.23.1-7.23.16.
331. Krémer, V., Godon, O., Bruhns, P., Jönsson, F., and de Chaisemartin, L. (2023). Isolation methods determine human neutrophil responses after stimulation. *Frontiers in Immunology*, 14, 1301183.
332. García-García, E., Uribe-Querol, E., and Rosales, C. (2013). A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*, 74, 50410.
333. Muñoz-Buenrostro, A., Arce-Mendoza, A. Y., Montes-Zapata, E. I., Calderón-Meléndez, R. C., and Montelongo-Rodríguez, M. J. (2020). Simplified neutrophil isolation protocol. *International Journal of Immunology and Immunotherapy*, 7, 041.
334. Contessa, C., Ramonda, R., Lo Nigro, A., Modesti, V., Lorenzin, M., Puato, M., Zanon, M., Balbi, G., Doria, A., and Punzi, L. (2009). Subclinical atherosclerosis in patients with psoriatic arthritis: a case-control study. Preliminary data. *Reumatismo*, 61(4), 298-305.
335. Mazlan, S. A., Said, M. S. M., Hussein, H., Shamsuddin, K., Shah, S. A., and Basri, H. (2009). A study of intima media thickness and their cardiovascular risk factors in patients with psoriatic arthritis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 52(3), 107-116.
336. Feld, J., Nissan, S., Eder, L., Rahat, M. A., Elias, M., Rimar, D., Laor, A., Bitterman, H., and Zisman, D. (2018). Increased prevalence of metabolic syndrome and adipocytokine levels in a psoriatic arthritis cohort. *Journal of Clinical Rheumatology*, 24(6), 302-307.
337. Skrzeczynska-Moncznik, J., Włodarczyk, A., Zabieglo, K., Kapinska-Mrowiecka, M., Marewicz, E., Dubin, A., Potempa, J., and Cichy, J. (2012). Secretory leukocyte proteinase inhibitor-competent DNA deposits are potent stimulators of plasmacytoid dendritic cells: implication for psoriasis. *Journal of Immunology*, 189(4), 1611-1617.
338. Lee, B.-W., and Moon, S.-J. (2023). Inflammatory cytokines in psoriatic arthritis: understanding pathogenesis and implications for treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11662.

339. Martinelli, S., Urosevic, M., Daryadel, A., Oberholzer, P. A., Baumann, C., Fey, M. F., Dummer, R., Simon, H.-U., and Yousefi, S. (2004). Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 44123-44132.
340. Yu, Y., and Su, K. (2013). Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical and Cellular Immunology*, 4, pii: 139.
341. Branzk, N., and Papayannopoulos, V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Seminars in Immunopathology*, 35, 513-530 (2013).
342. Papadaki, G., Kambas, K., Choulaki, C., Vlachou, K., Drakos, E., Bertias, G., Ritis, K., Boumpas, D. T., Thompson, P. R., Verginis, P., and Sidiropoulos, P. (2016). Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation. *European Journal of Immunology*, 46(11), 2542-2554.
343. Wu, S., Peng, W., Liang, X., and Wang, W. (2021). Anti-citrullinated protein antibodies are associated with neutrophil extracellular trap formation in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(3), e23662.
344. Denny, M. F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S. G., Anderson, M., Sandy, A. R., McCune, W. J., and Kaplan, M. J. (2010). A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *Journal of Immunology*, 184(6), 3284-3297.
345. Leffler, J., Martin, M., Gullstrand, B., Tydén, H., Lood, C., Truedsson, L., Bengtsson, A. A., and Blom, A. M. (2012). Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *Journal of Immunology*, 188(7), 3522–3531.
346. Chimenti, M. S., Triggianese, P., Nuccetelli, M., Terracciano, C., Crisanti, A., Guarino, M. D., Bernardini, S., and Perricone, R. (2015). Auto-reactions, autoimmunity and psoriatic arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 14(12), 1142–1146.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

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		Psöriatik artritte NETozis gelişimi ve etkileyen faktörlerin klinik bulgular ile ilişkisinin romatoid artrit ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi								
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL								
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ		İmmünoloji Anabilim Dalı / GÜTF								
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)										
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR		DVM-doktora öğrencisi Payam Nematiattar, Doç. Dr. Berivan Bitik, Biyolog doktora öğrencisi Senem Koçak, Prof. Dr. Hatice Kibriya Fidan								
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ		Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Hücre ve doku kültürleriyle yapılacak in-vitro çalışmalar-Doktora tezi								
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ	☐		ÇOK MERKEZLİ	☒		ULUSAL	☒	ULUSLARARASI	☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı		Tarihi	Ver.No	Dili						
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		10.05.2022	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐						
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU		10.05.2022	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐						
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı				Açıklama						
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		☒								
	BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU		☐								
	DİĞER		☐								
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 363		Toplantı tarihi: 16.05.2022								
	Psöriatik artritte NETozis gelişimi ve etkileyen faktörlerin klinik bulgular ile ilişkisinin romatoid artrit ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi 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 İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu								
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI			Prof. Dr Ebru ARHAN								
Unvanı/Adı/Soyadı		Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırmayla ilişkisi		Katılım				
Prof. Dr. Ebru ARHAN BAŞKAN		Çocuk Sağ. ve Hast. AD. Nöroloji BD	GÜTF	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐					

EK-1. Etik Kurul Onayı (devam)

Doç. Dr. Gökçe Sevim ÖZTÜRK FİNCAN BAŞKAN YARD.	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL BİLDİRİMLERDEN SORUMLU ÜYE	Tıbbi Biyokimya AD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN ÜYE	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒
Prof. Dr. Ö. Sezai LEVENTOĞLU ÜYE	Genel Cerrahi Anabilim Dalı	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Çiğdem ÖZER ÜYE	Fizyoloji AD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Çiğdem ATAMAN HATİPOĞLU ÜYE	Enfeksiyon Hast ve Klinik Mik Kliniği AD.	Sağ.Bil.Univ. Ankara Egt Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Müge AYDOĞDU	Göğüs Hastalıkları AD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Hamit KÜÇÜK ÜYE	İç Hastalıkları AD Romatoloji BD	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Halit Nahit ŞENDUR ÜYE	Radyoloji AD.	GÜTF	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Öğr. Gör. Dr. İrem EKMEKÇİ ERTEK ÜYE	Psikiyatri AD.	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Öğr. Gör. Dr. Cansu ÖZBAŞ ÜYE	Halk Sağlığı	GÜTF	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
İpek GÜVENÇ ÜYE	Hukukçu	Ankara Barosu	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Nejla CAN GÜLER ÜYE	Sivil Temsilci	Sağ.Bak. Avrupa Birl. ve Dış İliş.Gn.Md.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : NEMATIATTAR Payam

Uyruğu : İran

Doğum tarihi ve yeri :

Medeni hali :

Telefon :

e-posta :

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi/ İmmünoloji bölümü	Devam Ediyor
Yüksek lisans	Azad Tabriz Üniversitesi/ Veteriner Fakültesi	2009
Lise	Danesh Pajouh Lisesi	2003

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2014- devam ediyor	Shafagostar şirketi	Teknik Memuru

Yabancı Dili

İngilizce

Farsça

Hobiler

Satranç, Bilgisayar teknolojileri ve sanat tarihi kitapları okumak



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..



Gazi gelecektir...

