ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAK POPÜLASYONUNDA ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA PAD GENİNİN ORTAK MUTASYONUNUN ANALİZİ

Raad Maher Lafta LAFTA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Raad Maher Lafta LAFTA tarafından hazırlanan **"Irak Popülasyonunda Romatoid Artritli Hastalarda PAD Geninin Ortak Mutasyonunun Analizi"** adlı tez çalışması 28/12/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Owayes Muaffak Hamed AL-HASSANI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoloji
Gazi Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Biyoloji
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebru Gül
Biyoloji
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Irak Popülasyonunda Romatoid Artritli Hastalarda PAD Geninin Ortak Mutasyonunun Analizi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim 28/12/2022).

Raad Maher Lafta LAFTA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAK POPÜLASYONUNDA ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA PAD GENİNİN ORTAK MUTASYONUNUN ANALİZİ

Raad Maher Lafta LAFTA

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Owayes Muaffak Hamed AL-HASSANI

Bu çalışmaya yaşları 25-35 arasında değişen 64 Romatoid Artrit (RA) hastası ve 32 sağlıklı kişi olmak üzere toplam 96 kişi katılmıştır. İncelemelerde kullanılacak kan örnekleri, Dhuluiya Genel Hastanesi'nde Mart-Mayıs 2022 tarihleri arasında alınmıştır. Romatoid artritli hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında ortalama yaş ve cinsiyette önemli farklılıklar bulunmuştur. Romatoid artritli hastalar genellikle 31-35 yaşları arasında ve kadınlarda fazladır. Hasta grubunda tespit edilen ortalama anti-CCP ve PADI4 seviyeleri kontrol grubundan önemli ölçüde daha yüksektir. PADI 4 geninin polimorfizmi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar lojistik regresyon analizi kullanılarak, belirli aleller ve genotipler ile RA riski arasında anlamlı bir ilişki ortaya koymuştur. Ayrıca, Tetra ARMS-PCR yöntemi kullanılarak yapılan testlerde hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında önemli bir değişiklik görülmemiştir. RA'lı hastalarda, heterozigot CT genotip tekrar oranı, kontrol grubuna kıyasla %48,4'lük bir yüzde ile en yüksektir. Normal genotip oranı ise hasta grubunda %43,8 ile en düşüktür. Hasta grubunda mutant TT genotip %7,8 olarak belirlenmiştir. Alellerin sıklığına ilişkin bulgulara göre, hasta grubun mutant T aleli yüksek bir orana sahiptir. Ayrıca; TT, CT ve alel T genotipleri, romatoid artrit için risk faktörü olarak görülmektedir. Heterozigot CG genotipi RA hastalarında %60,9'dur. Normal genotip CC yüzdesi ise kontrol grubunda ise %40,6 olarak tespit edilmiştir. Mutant GG genotipi hasta grubunda %14,1 olarak belirlenmiştir. Alel frekansı açısından, hasta grubunda mutant G aleli oranı daha yüksek (%44,54) iken kontrol grubunda daha düşüktür (%35,9). Normal C aleli ise kontrol grubunda daha yüksek (%64,1) bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre olasılık GG genotipi ve G aleli romatoid artrit için risk faktörü olarak görülmektedir.

2022, 52 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: PADI geni, Romatizmal eklem iltihabı, ARMS-PCR,

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ANALYSIS COMMON MUTATION OF PAD GENE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS IN IRAQI POPULATION

Raad Maher Lafta LAFTA

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Owayes Muaffak Hamed AL-HASSANI

A total of 96 people, 64 patients with Rheumatoid Arthritis (RA) and 32 healthy people, aged between 25-35, participated in this study. Blood samples to be used in the examinations were taken at Dhuluiya General Hospital between March-May 2022. Significant differences in mean age and gender were found between patients with rheumatoid arthritis and the healthy control group. Patients with rheumatoid arthritis are usually between the ages of 31-35 and it is more common in women. The mean anti-CCP and PADI 4 levels detected in the patient group were significantly higher than the control group. The polymorphism of the PADI 4 gene was studied using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The results obtained using logistic regression analysis revealed a significant association between certain alleles and genotypes and the risk of RA. In addition, no significant difference was observed between the patient and healthy control groups in the tests performed using the Tetra ARMS-PCR method. In patients with RA, the heterozygous CT genotype repeat rate is highest at 48.4% compared to the control group. The normal genotype rate was the lowest in the patient group with 43.8%. Mutant TT genotype was determined as 7.8% in the patient group. According to the findings regarding the frequency of alleles, the mutant T allele of the patient group has a high proportion. Moreover; TT, CT and allelic T genotypes are seen as risk factors for rheumatoid arthritis. Heterozygous CG genotype is 60.9% in RA patients. The normal genotype CC percentage was found to be 40.6% in the control group. The mutant GG genotype was determined as 14.1% in the patient group. In terms of allele frequency, the mutant G allele rate was higher in the patient group (44.54%) while it was lower in the control group (35.9%). The normal C allele was found to be higher in the control group (64.1%). According to the results obtained, probability GG genotype and G allele are seen as risk factors for rheumatoid arthritis.

2022, 52 pages

Keywords: PADI gene, Rheumatoid arthritis, ARMS-PCR

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

İlk olarak, akademik kariyerimin ve hedeflerinin peşinden giderken bana verdiği inanç için "Tanrı"ya şükranlarımı sunuyorum. Bu çalışma sırasında gerekli kolaylıkları sağlayan Tikrit Üniversitesi ve Yaşam Bilimleri Bölümü'ne teşekkür ederim. Çalışmam boyunca sağladıkları rehberlik, yardım ve teşvikleri için danışmanım Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Owayes Muaffak Hamed AL-HASSANI'ye, tüm aile bireylerime, arkadaşlarıma ve çalışmalarımda bana destek olan herkese teşekkür ederim.

Raad Maher Lafta LAFTA

Çankırı, Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Romatoid Artrit (RA) **3**
2.2 Romatoid Artrit Belirtileri **4**
2.3 Romatoid Artrit Teşhisi ve Kategorizasyonu **5**
2.4 Romatoid Artrit Etiyolojisi ve Patogenezi **6**
2.5 Romatoid Artriti Etkileyen Faktörler **7**
2.5.1 Genetik faktörler **7**
2.5.2 Çevresel faktörler **8**
2.5.3 Hormonal faktörler **9**
2.6 Romatoid Artrit 'in İnflamatuar Belirteçleri **9**
2.6.1 Eritrosit sedimantasyon hızı (ESR) **10**
2.6.2 C-reaktif protein (CRP) **10**
2.6.3 Romatoid faktör (RF) **11**
2.6.4 Anti-siklik sitrüline peptid antikorları (Anti-CCP) **11**
2.6.5 Anti-PADI4 antikorları **14**
2.7 PADI-4 Geni **15**
3. MATERYAL VE METOT **17**
3.1 Materyal **17**
3.1.1 Çalışma örnekleri **17**
3.1.2 Kan örneklerinin toplanması **17**
3.1.3 Çalışmada kullanılan kimyasallar **18**

3.1.4 Çalışmada kullanılan araç ve gereçler 18
3.1.5 Kitler 20
3.2 Yöntemler 20
3.2.1 Moleküler yöntemler 20
3.2.2 Enzim deneyi 22
3.2.3 Primerler 22
3.2.4 PCR-ARMS yöntemi 23
3.3 İstatistiksel analiz 24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 26
4.1 Numunelerin Özellikleri 26
4.2 Anti-Sitrüline Protein (Anti CCP) ve Peptidil Arginin Deiminaz 4 (PADI4) Konsantrasyonunun Hesaplanması 27
4.3 Moleküler Deneyler 29
4.3.1 Çeşitli genotiplerin sıklığı ve PADI4 geninin rs11203366 (163A/G) polimorfizmi için alellik görüntüleme yüzdesi 29
4.3.2 Çeşitli genotiplerin sıklığı ve PADI4 geninin rs11203367 (245C>T) polimorfizmi için alellik görüntüleme yüzdesi 30
4.3.3 Çeşitli genotiplerin sıklığı ve PADI4 geninin rs874881 (335 C>G) polimorfizmi için alellik görüntüleme yüzdesi 32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 36
KAYNAKLAR 37
ÖZGEÇMİŞ 52

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
℃	Santigrat derece
kDa	Kilodalton
L	Litre
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

ACPA	Anti-sitrülin antikoru
ACR	Amerikan romatoloji koleji
Anti-CCP	Anti-siklik sitrüline protein antikorları
CRP	C-reaktif protein
DW	Damıtılmış su
EAAR	Avrupa artrit ve romatizma derneği
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent deneyi
ESR	Eritrosit sedimantasyon hızı
EULAR	Romatizmal hastalıklar için sınıflandırma sistemi
HCL	Hidroklorik asit
IL-1β	İnterlökin-1β
KOH	Potasyum hidroksit
PAD	Peptidil arginin deiminaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RA	Romatizmal eklem iltihabı
RF	Romatoid faktörler
TNFa	Tümör nekroz faktörü α

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Romatoid artrit belirtileri (Crouthamel *et al.* 2018) 5
Şekil 2.2 Romatoid artritte anti-sitrulin tepkileri (Guo *et al.* 2018) 7
Şekil 3.1 İstatiksel işlem 25
Şekil 4.1 RA Hastaları ve kontrol gruplarında PADI4 geninin rs11203366 (163A/G) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü 29
Şekil 4.2 RA hasta grubu için PADI4 geninin rs11203367 (245 C>T) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü 31
Şekil 4.3 RA kontrol grubu için PADI4 geninin rs11203367 (245C>T) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü 31
Şekil 4.4 RA Hasta grubu için PADI4 geninin rs874881 (335 C>G) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü 33
Şekil 4.5 RA kontrol grubu için PADI4 geninin rs874881 (335 C>G) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Romatoid artritin tanımlanmış otoantijenleri 4
Çizelge 2.2 Romatizmal hastalıklar için sınıflandırma sistemi 6
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar 18
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar 19
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitler 20
Çizelge 3.4 PADI4 rs11203366 primer dizisi 23
Çizelge 3.5 PADI4 rs11203367 primer dizisi 23
Çizelge 3.6 PADI4 rs874881 primer dizisi 23
Çizelge 3.7 rs11203366 amplifikasyonunu gösteren program 23
Çizelge 3.8 rs11203367 amplifikasyonunu gösteren program 24
Çizelge 3.9 rs874881 amplifikasyonunu gösteren program 24
Çizelge 4.1 İncelenen popülasyonların genel özellikleri 26
Çizelge 4.2 Hasta ve kontrol grubunda CCP VE PADI4 seviyelerinin karşılaştırılması 28
Çizelge 4.3 PADI4 geni rs11203367 polimorfizminin farklı genotiplerinin alel görüntüleme yüzdesi 30
Çizelge 4.4 PADI4 geni rs874881polimorfizminin farklı genotiplerinin alel görüntüleme yüzdesi 32

1. GİRİŞ

Romatoid artrit (RA), her 1000 kişiden yaklaşık 5'inde önemli eklem hasarına ve işlev bozukluğuna neden olan kronik inflamatuar bir hastalıktır. RA, kemik erozyonu, kıkırdak kaybı ve sinoviyal hiperplazi ile karakterizedir. Artralji, ödem, kızarıklık ve hatta açıklığının azalması simetrik eklem tutulumunun klinik belirtileridir (Guo *et al.* 2018).

Durum bozulmaya neden olabilir, birkaç organı içerebilir, sistemik sorunlara neden olabilir ve eşzamanlı kardiyovasküler hastalık riskini artırabilir (Figus *et al.* 2021). Romatoid artrit, nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler ve lenfositler dahil olmak üzere çok çeşitli bağışıklık hücrelerinin ve sinoviyal fibroblastlar, kondrositler ve osteoblastlar gibi yerleşik hücreler tarafından eklem dokularına sızmasından kaynaklanır (Fang *et al.* 2020). Bu süreç birbiriyle örtüşen üç mekanizma içerir: immünolojik işlev bozukluğu, sinovyal hiperplazi ve iltihaplanma. Sinoviyal hiperplazi, çok sayıda sitokin ve enflamatuar kimyasal üreten sinovyum içinde artan bağışıklık hücrelerinin birikmesiyle ortaya çıkar (Han *et al.* 2021).

PAD proteinleri olarak bilinen enzimler, romatoid artritin patofizyolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan, sitrulinasyon veya deaminasyon adı verilen bir post-translasyonel modifikasyon (PTM) gerçekleştirir. PADI enzim ailesinin üç üyesi; PADI2, PADI3 ve PADI4 otoantikorları romatoid artrit ile yakın zamanda ilişkilendirilmiştir (Darrah *et al.* 2018, Willis *et al.* 2017).

Romatoid faktörler (RF) ve anti-CCP en yaygın serolojik göstergeler olmasına rağmen, seropozitif bireylerde RA dışlanamaz. Büyük ölçüde, romatoid artrit (RA) tanısı, hastalığın fiziksel belirtileri gözlemlenerek konur. Günümüzde bu alanda serolojik ve immünolojik araştırmalar önem kazanmaktadır (Nishimura *et al.* 2007). Anti-CCP'nin RA'da prognostik ve prognostik belirteç olarak kullanım özgüllüğü ise %95-98'dir (Heidari *et al.* 2009) Anti-CCP antikorlarının, romatoid artritin başlangıcını güçlü bir şekilde tahmin ettiği ve semptomların başlamasından yıllar önce ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (Popescu *et al.* 2013). RA teşhisindeki en büyük zorluklardan biri, anti-

CCP üretimi artrit başlangıcından önce oluşması ve serum otoantikorlarının negatif kaldığı erken inflamatuar monoartrit vakalarının belirlenmesidir. (Heidari *et al.*2010) çalışmasına göre, serum öncesi oluşan anti-CCP umut verici bir teşhis aracıdır. Sinovyum, sitrülin içeren proteinler üretir ve RA'nın erken evrelerinde, lokal plazma hücreleri tarafından anti-CCP üretimi ile karakterize edilir (Caspi *et al.* 2006). Bununla birlikte, son araştırmalar, reaktif artrit ve osteoartrit gibi artritin birçok formunda CCP antagonistlerinin yerel olarak saptandığını göstermiştir (Vossenaar *et al.* 2004). RA için anti CCP'nin tanısal önemi yalnızca birkaç çalışmada araştırılmıştır (Olivares-Martínez *et al.* 2016).

Bu çalışmada, Romatoid artritte anti-PADI4 ve anti-CCP antikorları ile ilgili son bulgular özetlenmiş ve PADI genindeki genetik varyantların tanımlanması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Romatoid Artrit (RA)

Enflamasyon ve eklem dejenerasyonu, hastaların yaşam kalitesini düşüren bağ dokusunun kronik inflamatuar hastalığı olarak bilinen romatoid artritin ayırt edici özellikleridir (Choy and Calabrese 2018). Romatoid artrit, küresel sakatlığın 42. önde gelen nedenidir ve tedavi edilmezse kemik yüzeylerinin aşınması nedeniyle kalıcı fonksiyon kaybına yol açabilir (Jalil *et al.* 2016). Eklemler birincil hedef olmasına rağmen, hastalığın romatizmal nodüller, vaskülit ve sistemik komorbiditeler gibi eklem dışı belirtileri, başlı başına bir hastalık olarak tedavi edilmesi gerekliliğini ortaya koyar (Marcucci *et al.* 2018).

Kadınlarda görülen RA vakaları, erkeklerden iki ile dört kat daha fazladır ve çoğu vaka 40-60'lı yıllara kadar ortaya çıkmayabilir (Otón and Carmona 2019). 1975'te Irak'ta her 100,000 kişide, erkeklerde 455–kadınlarda 1546 yeni RA vakası tespit edilmiştir. Ancak 1990 yılında Dünya Sağlık Örgütü değerlendirmeleri, Irak'ta romatoid artrit sıklığının arttığını göstermiştir (Symmons and Silman 2006). Otoimmünite geliştirmek, ardından lokal inflamasyon ve son olarak kemik hasarından kaçınmak, romatoid artritin patofizyolojisinin üç aşamasıdır (Mahmood *et al.* 2017).

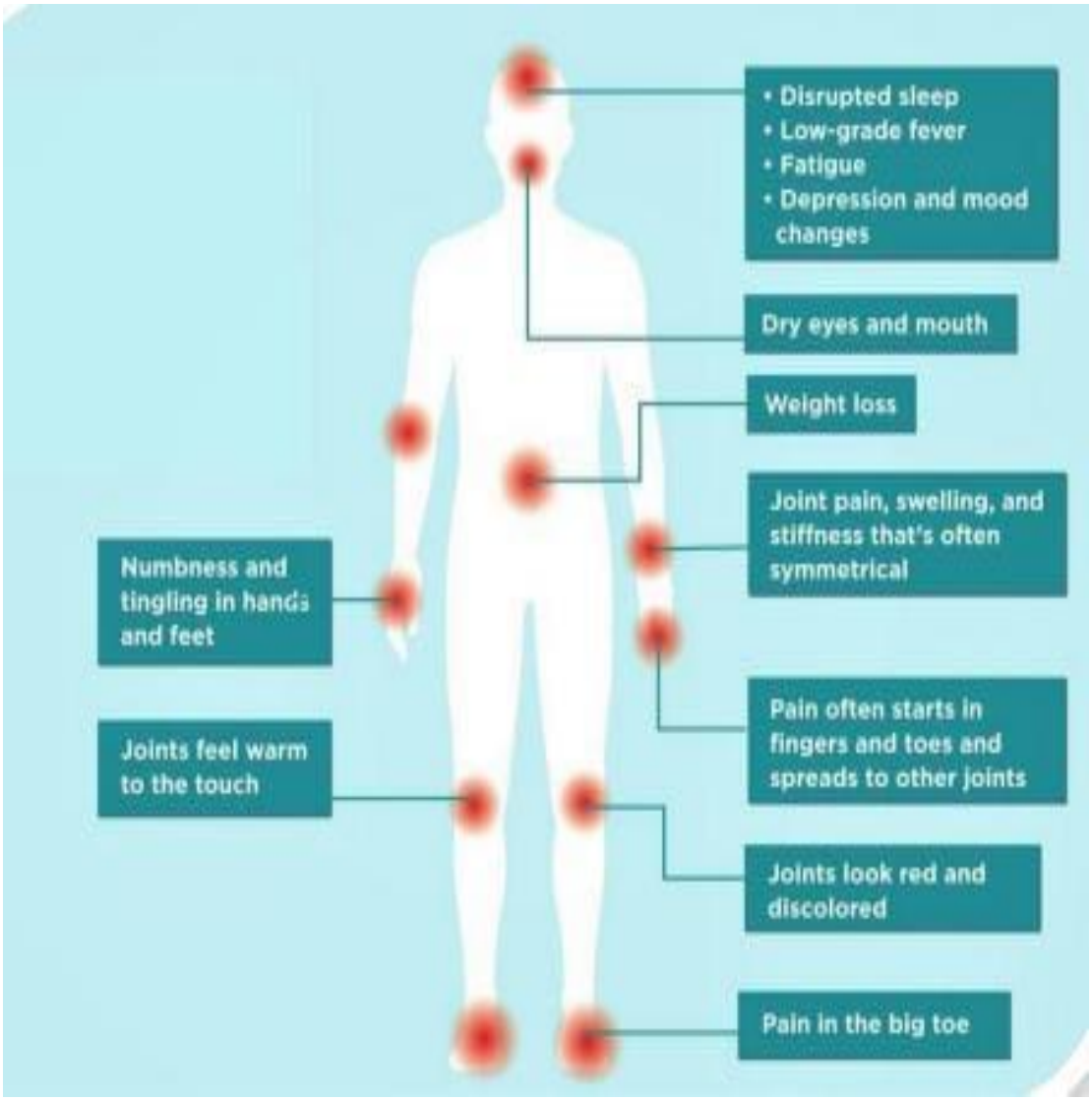
Çeşitli kıkırdak bileşenleri, stres proteinleri, enzimler, nükleoproteinler ve sitrulinli proteinler, romatoid artritte antikorların çoğunun hedef aldığı otoantijenler tarafından tanınır (Song and Kang 2010). Hem B hem de T hücrelerinde otoreaktivite birikimi, tek bir otoantijen varlığından ziyade RA'nın özelliğidir (Çizelge 2.1) (Song and Kang 2010). Otoantikorlar, romatoid faktörler (RF) ve anti-sitrüline epitop protein (ACCP) antikorları, RA'nın klinik belirtilerinden önce ortaya çıkabilen ve hem genetik hem de çevre tarafından etkilenen temel bir otoimmünite semptomudur (Shabgah *et al.* 2019). Enflamasyon ve hastalığın gelişimi boyunca, sitokinler hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık tepkilerinde kritik bir rol oynar (Gianchecchi *et al.* 2018).

Çizelge 2.1 Romatoid artritin tanımlanmış otoantijenleri

Kıkırdak bileşenleri	**Tip-II kolajen (doğal ve denatüre)**
Stres proteinleri	Mikrobiyal Hsp65, Bip
Enzimler	α-enolaz, glukoz-6-fosfat izomeraz, kalpastatin
Nükleer proteinler	RA33/hnRNP A2
Sitrüline proteinler	Filagrin, fibrin, fibrinojen, vimentin, tip I ve II kolajenler, α-enolaz, sentetik sitrüline peptidler

2.2 Romatoid Artrit Belirtileri

Romatoid artrit hastaları tipik olarak birden fazla eklemde ağrı ve sertlik yaşarlar (Littlejohn and Monrad 2018). Bilek eklemleri, proksimal falanks ve metakarpophalangeal en tipik yaralanma bölgeleridir (Mo *et al.* 2019). Bir saatten fazla sabah tutukluğu iltihabik nedenlere işaret eder (Orange *et al.* 2020). Fiziksel muayenede sinovit, eklem şişmesi veya sinoviyal zarın biraz kalınlaşması olarak kendini gösterebilir. Belirgin eklem şişmesine ek olarak, hastalarda, aktif hastalık sırasında yorgunluk, kilo kaybı ve düşük dereceli ateş gibi daha hafif belirtiler olabilir (Şekil 2.1) (Wasserman 2011).



Şekil 2.1 Romatoid artrit belirtileri (Crouthamel *et al.* 2018)

2.3 Romatoid Artrit Teşhisi ve Kategorizasyonu

Romatoid artrit tanısı; klinik belirtiler, laboratuvar testleri ve radyografik bulgular kullanılarak belirlenir (Ebel and O'Dell 2021). 2010 yılında Amerikan Romatoloji Koleji (ACR) ve Avrupa Artrit ve Romatizma Derneği (EAAR) romatizmal hastalıklar için sınıflandırma sistemlerini (EULAR) güncelledi. 2010 yılı kriterlerine göre (Çizelge 2.2), nihai bir RA, 6 puan olarak tanımlanır ve toplam 10 puan mevcuttur (RF, anti-sitrülin antikoru (ACPA), eritrosit sedimantasyon hızı (ESR) ve C-reaktif protein (CRP) (Aletaha and Smolen 2018).

Çizelge 2.2 Romatizmal hastalıklar için sınıflandırma sistemi

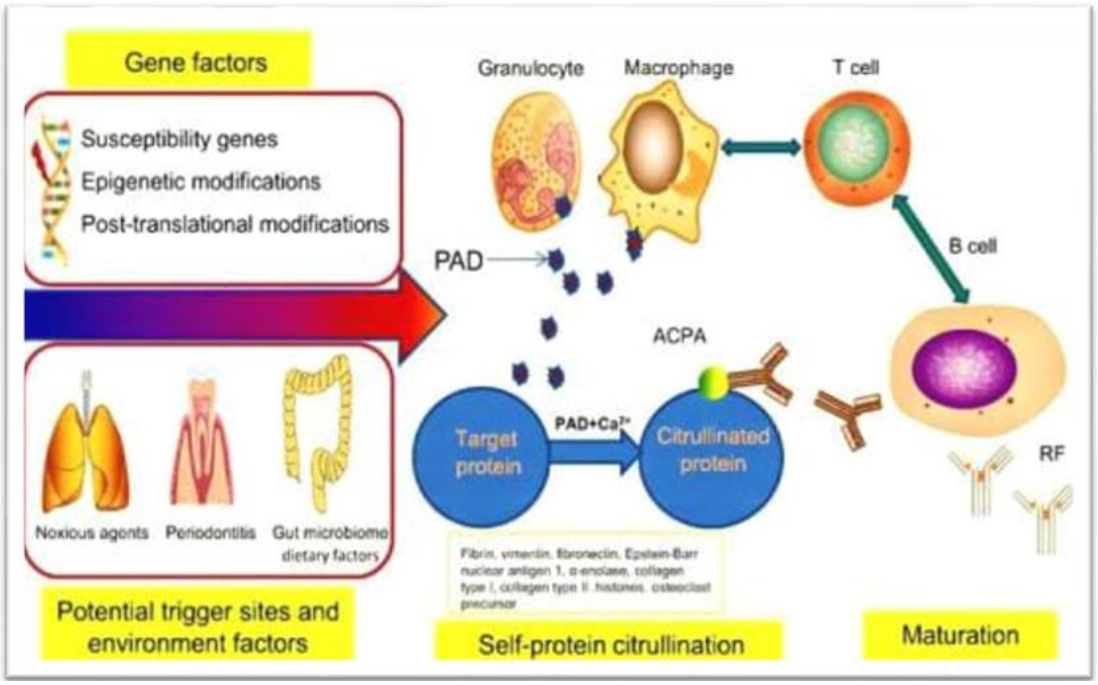
En az bir eklemde semptomatik sinoviti olan veya sinoviti başka bir hastalıkla daha iyi açıklanamayan hastalar hedef popülasyonu oluşturur.	
Kategori A – Eklem tutulumu	**Skor**
1 büyük eklem 2−10 büyük eklem 1−3 küçük eklem 4−10 küçük eklem (büyük eklemlerin dahil olduğu veya olmadığı) >10 eklem (en az bir küçük eklem)	0 1 2 3 4
Kategori B – Seroloji (sınıflandırma için en az 1 test sonucu gereklidir)	
Negatif RF ve negatif ACPA Düşük pozitif RF veya düşük pozitif ACPA Yüksek pozitif RF veya yüksek pozitif ACPA	0 2 3
Kategori C – Akut faz reaktanları (sınıflandırma için en az 1 test sonucu gereklidir)	
Normal CRP ve normal ESR Anormal CRP veya anormal ESR	0 1
Kategori D – Semptomların süresi	
<6 hafta semptom süresi ≥6 hafta semptom süres	0 1

2.4 Romatoid Artrit Etiyolojisi ve Patogenezi

Etiyolojisi karmaşık ve çeşitli olan romatoid artritin, köklerinin hem kalıtsal hem de çevresel nedenlerden kaynaklandığı ve ikisi arasındaki etkileşimlerin hastalığın patogenezinde rol oynayan immünolojik anormalliklere katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Zamanpoor 2019).

Romatoid artritte, genetik-çevre etkileşimlerinin, hastaların bağışıklık sistemlerini endojen proteinlere, özellikle post-translasyonel modifikasyondan kaynaklanan bir sitrülin peptidi içerenlere karşı toleransını kaybetmeye teşvik ettiği düşünülmektedir. Anti-sitrulin tepkileri, ikincil lenfoid dokularda ve organlarda veya muhtemelen kemik iliğinde bu olayların tetiklenmesi ve başlamasıyla T ve B lenfosit bölmelerinde bulunabilir (Şekil 2.2). Bundan sonra, mikrovasküler, nöronal, biyomekanik ve dokuya

özgü immün bileşenler dahil olmak üzere eklemlerde lokalize bir enflamatuar yanıt meydana gelir ve farklı humoral ve hücresel immün yanıtları içerebilir, sinüzit, romatoid artrit gelişimine yardımcı olan bu süreçler nedeniyle başlar ve devam eder (McInnes and Schett 2011).



Şekil 2.2 Romatoid artritte anti-sitrulin tepkileri (Guo *et al.* 2018)

2.5 Romatoid Artriti Etkileyen Faktörler

Romatoid artriti etkileyen üç faktör bulunmaktadır. Bunlar;

2.5.1 Genetik faktörler

İkiz olma durumu, aile, genom çapında ilişkilendirme (GWA) çalışmaları gibi genetik değişkenler RA gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (Torkamani *et al.* 2019). Tek yumurta ikizleri arasında RA için bildirilen evlilik uyum oranı %9,3-15,4 iken dizigotik ikizlerde bu oran sadece %2,3-3,6'dır. Bu çalışmalar, RA'nın %53 ile %65 arasında kalıtsal olduğunu göstermektedir. Bu genetik katkı, analiz edilen bireylerin cinsiyetinden,

yaşından, hastalık başlangıcından veya hastalık şiddetinden bağımsızdır (Terao *et al.* 2016).

Aile çalışmaları, bu bulguları ve RA'nın kalıtsallığını, etkilenen ebeveynlerin, kardeşlerin, çoğul ailelerin, ikizlerin ve çiftlerin çocuklarında RA için tahmini riskleri hakkında bilgi vermektedir. Vaka kontrol analizleri ve genetik belirteç araştırmaları, insan lökosit antijeni (HLA) sisteminin belirli alellerinin romatoid artrit gelişme riskinin artmasıyla bağlantılı olduğunu bulmuştur (Kennedy *et al.* 2015, Qiu *et al.* 2017). Lenfositler (T hücreleri ve B hücreleri) ve makrofajlar, görevlerini yerine getirmek için bu genlerin birçoğuna güvenirler (Fang *et al.* 2018). Ek olarak, tek nükleotit polimorfizmleri (SNP'ler), romatoid artrit gelişme riskinin artmasıyla bağlantılı olan bir dizi ek gendeki varyasyonları tanımlamak için kullanılmıştır (Osorio *et al.* 2018).

2.5.2 Çevresel faktörler

Genetik polimorfizmlerin RA patogenezinde çok önemli bir rol oynadığı açık olmakla birlikte, genetik olarak yatkın kişilerde hastalığın gelişiminde çevresel değişkenlerin rol oynaması da mümkündür. Bununla birlikte, RA oluşumuyla ilişkili tek bir çevresel faktör tanımlanmamıştır, ancak birkaç risk faktörü bildirilmiş olmasına rağmen, örneğin sigara içmek, özellikle anti-ACCP antikorları olan bireylerde, RA insidansında iki kat artışla ilişkilendirilmiştir (Björk *et al.* 2020). Oral kontraseptif kullanımı, D vitamini eksikliği, aşırı kahve ve alkol alımı risk faktörleri olarak belirtilmiştir. Bununla birlikte, bu faktörlerin lehine kanıtlar zayıftır ve RA hastalarının periferik kanındaki, tükürüğündeki ve sinovyumundaki bağlı hücrelerde yüksek Epstein-Barr DNA yükü (EBV) ile ilişkili diğer çevresel değişkenler, Epstein-Barr virüsünün romatoid artritte rol oynamasına neden olabilir (Liao *et al.* 2009).

Ayrıca hastaların Epstein-Barr virüsü (EBV) ile enfekte olmuş B hücrelerini dolaşıma sokmaya zorlandığına dair kanıtlar ve bu durumda EBV'ye özgü T hücrelerinin aktivitesinde azalmalarını gösteren çalışmalar da vardır (Hussein and Rahal 2019). Klinik araştırmalar bakteriyel enfeksiyon ve hastalık arasında pozitif bir bağlantı olduğunu göstermiştir ve bu da mikrobiyal enfeksiyonun romatoid artritin gelişmesinde ve

ilerlemesinde rol oynadığı teorisini kanıtlamaktadır. Bakteriyel enfeksiyonların (*Streptococcus pyogenes, Porphyromonas gingivalis* ve *Proteus mirabilis*) hayvan deneylerinde artrit semptomları ürettiği ve şiddetlendirdiği bildirilmiştir (Dieterich *et al.* 2018).

Bunlara ek olarak, Irak'ta romatoid artrit hastalarından oluşan bir örneklemde Gram-negatif bakterilerin (*Proteus* spp. ve *Escherichia coli*) kronik idrar yolu enfeksiyonlarının %23,5'inden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Ad'hiah 2013). Hastalığın patogenezinde çevresel olaylarla karışan genetik faktörlerle belirlenebilir. Bu duruma, çevresel değişkenler (ör. sigara, obezite, D vitamini) ile mukozal mikrobiyotanın dahil olduğu çoklu mekanizmalar görülmektedir. İkizler arasında düşük uyum tespit edilmiştir, bu da çevresel etkilerin daha önemli bir rol oynadığı anlamına gelir (Aslani *et al.* 2018).

2.5.3 Hormonal faktörler

Kadınların romatoid artrit geliştirme olasılığı erkeklere göre 2-4 kat daha fazladır, ancak nedenleri çoğunlukla belirsizdir (Tang *et al.* 2021). Oral kontraseptifler, çeşitli çalışmalarda gelecekte romatoid artrite karşı profilaktik olarak bilinmektedir (Orellana *et al.* 2017, Deane *et al.* 2017).

Ayrıca romatoid artrit hamile kadınlarda daha az görülür, ancak doğumdan sonraki ilk yılda daha sık görülür. Bir kadının romatoid artrit geliştirme oranı hamilelik sırasında azalırken, doğumdan sonraki yıl içinde artar (Peschken *et al.* 2012). Elde edilen farklı sonuçlar, emzirme (Vieira Borba *et al.* 2018), menarş yaşı, menopoz yaşı ve menopoz sonrası hormon kullanımı (Pikwer *et al.* 2012) gibi diğer değişkenlerle de ilişkilendirilmiştir.

2.6 Romatoid Artrit 'in İnflamatuar Belirteçleri

Romatoid artrit tanı ve tedavisi için çok önemli olan çeşitli inflamatuar kan göstergelerinin yanı sıra eritrosit sedimantasyon hızı (ESR) önemli bir tol oynamaktadır.

Bunlara ek olarak, klinik uygulamada C-reaktif proteinin (CRP) kullanımı üzerine daha fazla araştırmalar yapılmıştır (Litao and Kamat 2014).

2.6.1 Eritrosit sedimantasyon hızı (ESR)

Klinik tıpta hastalık aktivitesi için en sık kullanılan laboratuvar testi, inflamatuar durumları ve romatoid artriti takip etmek için çok yararlı bir araç olan eritrosit sedimantasyon hızıdır (Targońska-Stępniak *et al.* 2020, Ramsa and Lerman 2015). Enflamasyonun başlaması, normal hücrelerin normal proteinlerden apolipoproteinleri atmasına neden olur. Romatoid eklem araştırmaları tarihinde saatte 20 ile 30 mm/saat daha yüksek bir ESR seviyesi anormal kabul edilir (Yılmaz *et al.* 2007). ESH, hastalığın ciddiyetini ve iyileşmesini değerlendirmek için çeşitli romatizmal kriterlerin yanı sıra tedavi çalışmalarında laboratuvar aktivitesinin çok önemli bir bileşenidir (Buzatu and Moots 2019). RA ile ilgili çok sayıda araştırmada, ESR'nin sonuçlarla ilişkili olduğu ve radyografik ilerlemeyi etkilediği gösterilmiştir (Romão *et al.* 2020).

2.6.2 C-reaktif protein (CRP)

İnflamatuar olaylar, en iyi bilineni C-reaktif protein olan beş proteinden oluşan bir kademeli dizi üretimini tetikler (Sproston and Ashworth 2018). CRP seviyeleri, test tarafından hemen değerlendirildiğinden, ESR seviyelerinden daha güvenilir bir inflamasyon göstergesi olarak kabul edilir. CRP, inflamatuar uyaranlara çok daha hızlı yanıt verdiğinden ve mevcut inflamasyonun zamanında teşhisi olarak kullanılabileceğinden, inflamatuar durumlarda ESR testine göre daha çok tercih edilir. 2010 yılında, (Breda *et al.* 2010) inflamatuvar bir belirteç olan C-reaktif proteinini, çeşitli çalışmalarda romatoid artritin daha hızlı radyografik gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Jonsson *et al.* 2017, Ansar and Ghosh 2013).

C-reaktif proteini, kompleman sisteminin uyarılmasında ve sitokinlerin, özellikle IL-6'nın üretilmesinde esastır (Tanaka and Kishimoto 2014, Sproston and Ashworth 2018). Bazı teorilere göre romatoid artritte kompleman aktivasyonunu kısmen düzenleyebilir

(Molenaar *et al.* 2001). Sürekli artan C-reaktif protein seviyelerinin, erken RA'da yaygın kemik kaybının başlamasıyla doğrudan bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Figueiredo *et al.* 2021).

Azalmış bir C-reaktif protein (CRP) seviyesi, hastalığı modifiye edici ilaçların kullanılmasında sonra ilk ölçülebilir değerdir (Genovese *et al.* 2019). Yükselmiş CRP, devam eden inflamasyonun hassas bir göstergesi olarak klinik değerlendirme ile kullanılabilirken, herhangi bir hastalığa özgü değildir. Kanser, pnömoni, lupus, romatoid artrit ve romatizmal ateş, CRP testinin pozitif olabileceği hastalıklar arasındadır. RA tanısından önce, C-reaktif proteinde preklinik artışlar görülmüştür (Nielen *et al.* 2004).

2.6.3 Romatoid faktör (RF)

Romatoid faktör (RF), elli yıldan fazla bir süre önce keşfedilen parçalanmış kristalize bölge (Fc) immünoglobulin G (IgG) antikorlarını hedef alan otoantikorları ifade eder. RA hastalarının %70-80'i, RA hastalarına özgü olmayan ancak Sjögren sendromu ve viral enfeksiyonlar gibi diğer otoimmün durumları (örn. tüberküloz ve hepatit) olanlarda görülen RF'den de muzdariptir (Maślińska *et al.* 2021, Elkayam *et al.* 2006).

2.6.4 Anti-siklik sitrüline peptid antikorları (Anti-CCP)

Anti-siklik sitrüline peptid antikorları, romatoid artrit hastalarında arginin amino asidinin modifiye edilmiş bir versiyonu olan sitrülini içeren peptitlere ve proteinlere karşı antikor üretimi hakkında önemli bir bulgu ilk olarak 1998'de tespit edilmiştir (Van Venrooij *et al.* 2011). Bir arginin-sitrulin kalıntısı içeren antijen determinantı ile etkileşime giren filagrin antikorları, anti-siklik sitrülin peptit antikorları olarak bilinir (Aggarwal *et al.* 2009). Yapılan araştırmalarda, CCP antagonistlerinin RF'ye göre daha üstün bir teşhis aracı olduğunu gösteren sonuçlar elde edilmiştir (Van Venrooij *et al.* 2008). Anti-sitrulin peptit (anti-CCP) antikorları %40 ile %80 hassas ve %81 ile %100 güçlü olarak değerlendirilir (Avouac *et al.* 2006) ve romatoid artriti saptamak için mükemmeldir (Hinks *et al.* 2018). Bu özellikler, antikorun romatoid artrit etiyolojisini izlemek için ne

kadar yararlı olduğunu göstermektedir (Nicaise Roland *et al.* 2008). RA numunelerinin %76'nın, nadir amino asit sitrülin içeren sentetik lineer peptidlerle reaktif olan otoantikorlara sahip olduğu bulunmuştur, bu da RA için yüksek derecede bir özgüllüğe işaret etmektedir. Ayrıca, sitrulin peptit (anti-CCP) antikorlarının, RA'nın erken evrelerinde saptanmasında yararlı olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Schellekens *et al.* 2000, Ramos and Macías 2021).

RA'yı erken bir aşamada tespit etme, erken sinovitli bireylerde RA'yı belirleme ve RA'yı sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi diğer bağ dokusu bozukluklarından ayırt etme kabiliyeti nedeniyle, CCP antagonistleri RA'nın biyobelirteci olarak önem arz etmektedir (Tampoia *et al.* 2005). Sitrülin, canlı organizmalarda kodlayıcı bir amino asit olarak işlev görmediğinden, sitrülin içeren peptidler, peptidil argininin enzimatik dönüşümü ile sentezlenmelidir. Bu dönüşüm, insan romatoid artrit (RA) sinovyal dokularında tanımlanmış olan, PADIs2 ve PADIs4 olan peptidil arginin deiminazlar (PAD'ler) enzimleri tarafından katalize edilir (Suzuki *et al.* 2005) ve PADIs4 geni RA'ya bağlanır (Li *et al.* 2020). Bu veriler, bu sitrülin içeren proteinlere karşı otoantikorların üretilmesinin ve endojen proteinlerin ekstraksiyonunun romatoid artritte patojenik rol oynadığının güçlü bir göstergesidir (Yang *et al.* 2021).

Birçok sağlık probleminde, PAD enzim aktivitesi dikkatle kontrol edilir; ancak birçok kanser türü (Yuzhalin 2019), nörolojik hastalıklar (Ishigami *et al.* 2005) ve otoimmün hastalıklar gibi bazı bozukluklar sitrülinasyon yolunun düzensizliğine neden olabilir (Anzilotti *et al.* 2010). Eklemlerde bulunan değişmiş antijenlere karşı hipernitrojenizm ve kimyasalların ve antikorların birikmesi, romatoid artriti karakterize eder. Sitrulinasyon, yeni (oto-)antijenlerin oluşumunu artırabilir ve bir otoimmün yanıtı başlatmaya yardımcı olabilir (Krishnamurthy *et al.* 2016). Sitrulinasyon ve PAD enzimlerinin tümü otoimmünite (NET'ler) ile ilgili olduğu bilinen apoptoz, otofaji ve nötrofil hücre dışı tuzaklarının oluşumunda önemli rollere sahiptir (Valesini *et al.* 2015). Nötrofillerin PADI4'ü enfeksiyon veya iltihaplanma sırasında aktive olur, bu da birkaç kendi kendine antijenin uyarılmasına (Wang *et al.* 2016) ve hücreden kromatinin dışarı atılmasına neden olarak enfeksiyon savunması için çok önemli araçlar olan ağlar oluşturur. Histon sitrulinasyonu bu süreçte kritik bir aşamadır (Wang *et al.* 2009). Ağların

oluşumunda PADI2'nin işlevi hakkında çok az bilgi vardır. PADI2'nin NET'lerin gelişimi için gerekli olduğunu, ancak TNF ve sitrüline bağlı artritin neden olduğu durumlar için gerekli olmadığını gösteren çalışmalar vardır (Bawadekar *et al.* 2017). Nötrofillerin NET'lere ve PAD'lere salınması muhtemelen sitrulinlenmiş hücre dışı antijenleri takip eder (Corsiero *et al.* 2016) ve enfeksiyöz ajanlarla (Deane *et al.* 2017) olan aktivasyonu (Okroj *et al.* 2007) immünolojik komplekslerin gelişimini tamamlar. Bağışıklık toleransı bozulduğunda, bağışıklık sistemini strese sokabilir ve artan bağışıklık sistemi "vuruşları" ve / veya PED aktivitesini artıran kofaktörler (örneğin otoantikorlar) nedeniyle bağışıklık savunmasını bozabilir (Darrah *et al.* 2013). Bu durum, sitrulinasyon verimliliğinin korunmasına yardımcı olabilir ve otoimmüniteye katkıda bulunabilir. Yeni çalışmalar, PAD4'ün proinflamatuar sitokinler IL-1 ve TNF'nin gelişimi için gerekli bir protein olan nükleer faktör B'yi (NF-B) doğrudan sitrüline ettiğini göstermiştir (Sun *et al.* 2017). PAD enzimlerinin katalitik aktivitesi için kalsiyum gerekli olduğundan, sitrulinasyon romatoid artritte inflamasyonun yayılmasına katkıda bulunabilir. Bu, romatoid artrit gelişiminin ve normal fizyolojinin çok çeşitli faktörlerden etkilenebileceğini göstermektedir. Öte yandan, PAD4 aktivitesi için optimal olduğu gösterilen in vitro kalsiyum konsantrasyonu, sinoviyal sıvıda görülenden daha yüksektir (Assohou-Luty *et al.* 2014). 1977'de, (Rogers *et al.* 1977), PAD enzimlerini ilk olarak tanımlamışlardır. PAD ailesinin üyelerinin substrat özellikleri ve dokuya özgü ifadeleri değişiklik gösterir. Bu durum PAD enzimlerinden kaynaklanmaktadır (Darrah *et al.* 2012). En yaygın izoform PADI2'dir. PADI2 substratları olduğu gösterilen en önemli iki protein iskelet ve bağ kaslarındaki vimentin ve beyindeki miyelin temel proteinidir (MBP). Çalışmalar, PADI2 ekspresyonunun hormonal düzenlemesinin dokuya özgü olduğunu göstermektedir (Mohanan *et al.* 2012). PADI2'nin çoğunlukla sitoplazmik olmasına rağmen, bu proteinin bir kısmının çekirdekte de bulunması ve burada histon H3 ve H4'ün uzaklaştırılmasından ve gen düzenlemesine katılımdan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (Cherrington *et al.* 2012). Çekirdekler, beyaz kan hücreleri (granülositler, monositler) dahil olmak üzere çok sayıda dokuda PADI4'ün birincil lokalizasyonudur, PADI3 ise büyük ölçüde saç foliküllerinde bulunur ve hücre içi olarak sitoplazmada lokalizedir (Vossenaar *et al.* 2004). Artmış enzimatik aktiviteye sahip olmanın yanı sıra, romatoid artrit hastalarının sinovyumundaki nötrofiller ve monositler, çeşitli sitrülin içeren proteinlerle birlikte PADI2 ve PADI4'ü aşırı eksprese eder (Foulquier *et al.* 2007). PADI4, romatoid artrit

için bir duyarlılık genidir (Iwamoto *et al.* 2006). Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), birkaç etnik grupta RA ile ilişkilendirilmiştir (Burr *et al.* 2010). Bu süreç, hücresel aktivasyon sırasında sitrülin içeren proteinlerin oluşumunun düzenlenmesine yardımcı olur ve PADI4'ün immünolojik yanıtı ve enzim yapısını etkileyerek kendiliğinden serbest kalabileceği göstermiştir (Andrade *et al.* 2010). Bununla birlikte, bu sonuçların terapötik etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. PADI4 için belirtilen hedeflerde PADI2 ve PADI4 arasında bazı örtüşmeler fark edilmiştir (Damgaard *et al.* 2018). Hücresel substratların ve üretilen peptitlerin enzim seçiciliği, PADI2 ve PADI4 için farklı görünmektedir ve arginin alıcı kalıntıları etrafındaki amino asit sentezi daha sınırlıdır (Assohou-Luty *et al.* 2014). ACPA hedefli sitrüline endojen proteinlerin yapımında hangi izoformun daha önemli olduğu şu anda belirsizdir. Son araştırmalar (Blachère *et al.* 2017), yüksek titreli ACPA'nın fibrinojeni sitrüline PADI2 yerine PADI4 yoluyla tercihli olarak bağladığını göstermektedir. Bu bireylerdeki Histon H3 otoantikorları, sitrülin aracılı antijeni PADI4 aracılığıyla seçiyor gibi görünürken, daha yakın tarihli çalışmalar, her iki enzimin de ACPA'lar için sitrülin hedefleri oluşturmada eşit derecede başarılı olduğunu öne sürmektedir (Damgaard *et al.* 2018).

2.6.5 Anti-PADI4 antikorları

RA hastalarında anti-PADI4 antikorları ilk kez 2003 yılında (Nissinen *et al.* 2003) tarafından tanımlanmıştır. Bu raporu takip eden yıllarda yapılan birçok çalışma, romatoid artritli kişilerde bu antikorların varlığını doğrulamıştır (Martinez-Prat *et al.* 2019). ACPA varlığı, RA hastalarının %20-45'inde görülen anti-PAD4 antikorlarının saptanmasına bağlıdır (Cappelli *et al.* 2018). Yapılan bir meta-analiz çalışmasına göre, anti-PAD4 antikorlarının RA'da %38'lik bir duyarlılığı ve %96,'lık bir özgüllüğü vardır ve RA hastalarının ve kontrollerinin sürekli olarak mükemmel bir şekilde ayırt edilmesini sağlarlar. Farklı kuruluşlar tarafından yürütülen birkaç çalışma anti-PAD4 antikorlarını incelemiş ve anti-PAD4 antikorlarının beklenmedik bir şekilde ACPA-negatif bireylerde bulunduğunu ve romatoid artritte serogrup açığını kapatmaya yardımcı olabileceklerini göstermiştir (Martinez-Prat *et al.* 2018, Ren *et al.* 2017). Anti-PAD4 antikorları, proteinin enzimatik aktivitesini inhibe ediyor gibi görünmektedir, ancak otoantikorların enzim fonksiyonu ve aktivitesi üzerindeki etkileri iyi bilinmemektedir (Auger *et al.* 2010).

Bununla birlikte, anti-PAD4 antikorları tarafından tanınan epitopların tam yerleşimini, dizisini ve mimarisini tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bazı RA hastalarının, hastalıklarının başlangıcından önce tespit edilebilir seviyelerde PAD4 antagonistleri sergilemesi merak uyandırıcıdır (Kolfenbach *et al.* 2010). Bununla birlikte, on yıllar boyunca toplanan numunelerin kullanıldığı bir askeri kohort çalışmasında, RA'nın gelişimi sırasında anti-PAD4 antikorlarının oluşumunun kesin olarak belirlenemediği ve bu yüzden daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır. Anti-PAD4 antikorlarını ölçmek için bir yöntem olarak immünopresipitasyonun düşük duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir; bu nedenle, bu sonuçların enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) veya en güncel PMAT sistemi gibi daha güncel yöntemler kullanılarak doğrulanması gerekir (Martinez-Prat *et al.* 2019). Böylece, ACPA ve RF'den sonra anti-PAD4 antikorlarının ortaya çıkıp çıkmadığı ve bunların RA'yı tahmin etmek veya hatta önlemek için kullanılıp kullanılamayacağı test edebilir (Mahler 2017). Aşılama yoluyla farelerde, PAD enzimleri ile ACPA sentezinin iyileştirilmesi ve anti-PAD4 antikorlarının gelişebilme olasılığı belirlenebilir (Arnoux *et al.* 2017). Bu durum, hayvan modellerinin, özellikle aşılama yoluyla üretildiğinde (otomatik modellerin aksine) her zaman insan hastalığını yansıtmaması ve RA hastalarının B hücresi repertuarını kullanarak potansiyel mutasyonların dizileme çalışmalarından ek bilgi sunmasıyla açıklanabilir (Elliott *et al.* 2018).

2.7 PADI-4 Geni

Peptidilarjinin Deiminazlar 4 (PADI-4), kromozom 1p36 üzerinde bulunur ve müteakip konformasyon değişiklikleri sitrülinin bir protein olmasına neden olursa, arginin kalıntılarının sitrüline translasyon sonrası modifikasyonu için gerekli katalitik enzimleri kodlar ve bu da farklı antijenleri nedeniyle bağışıklık toleransında bozulmaya neden olabilir. Kanıtlar, PADI-4 haplotipinin taşıyıcılarında PADI-4 mRNA stabilitesi ile RA duyarlılığı arasındaki bağlantıyı desteklemektedir (Suzuki *et al.* 2005). Artan stabilitenin bir sonucu olarak PADI-4 proteini birikir ve sitrülin içeren proteinler artar, her ikisi de sitrülin peptitlerine karşı otoantikorların üretimini destekler. PADI4 geni, argininin sitrülin kalıntılarına dönüştürülmesinde yer alan bir enzimi kodlar ve bu gen,

granülositlerin ve makrofajların olgunlaşmasında rol oynayabilir, bu da iltihaplanmayı ve immünolojik yanıtı başlatır (Kouzarides 2007).

Protein bir oligomerdir ve oligomerin her bir üyesi beş kalsiyum iyonunu bağlar.

Protein L-arginin + H_2O=protein L-citrulline + NH_3

2006 yılında, (Kang *et al.* 2006) tarafından yapılan çalışmada, Doğu Asya'da beş PADI4 SNP'nin (PADI4-89, PADI4-90, PADI4-92, PADI4-94 ve PADI4-104) RA ile güçlü bir ilişkisi olduğu tespit edilmiştir.

Romatoid artrit sinovyal doku, eozinofillerin ve nötrofillerin sitoplazmasında, çekirdeğinde ve sitoplazmik granüllerinde bulunan ancak periferik monositlerde veya lenfositlerde bulunmayan protein ile normal ekspresyona sahiptir (Kouzarides 2007)

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışma örnekleri

Bu çalışmaya yaşları 25-35 arasında değişen 64 Romatoid Artrit (RA) hastası ve 32 sağlıklı kişi olmak üzere toplam 96 kişi katılmıştır. İncelemelerde kullanılacak kan örnekleri, Dhuluiya Genel Hastanesi'nde Mart-Mayıs 2022 tarihleri arasında alınmıştır. Çalışmaya katılan hasta bireyler tıp uzmanları tarafından, Amerikan Romatoloji Derneği tarafından belirlenen yeni tanı kriterlerine uygun olarak; klinik muayene, röntgen ve laboratuvar testleri sonuçları kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmaya katılan bireylerle anket çalışması yapılmıştır.

3.1.2 Kan örneklerinin toplanması

Çalışmaya katılan tüm bireylerden tek kullanımlık plastik bir şırınga kullanarak (kol damarından) yaklaşık 10 mL kan örneği alınmıştır. Daha sonra alınan kan örnekleri her 5 mL olacak şekilde ikiye bölünmüştür.

1. Kısım: Serum, birkaç steril, sağlıklı gönüllüden ekstrakte edildi ve üç parçaya bölündü. Serumun iki bölümü daha düzgün bir şekilde ayrılmasını sağlamaya yardımcı olmak için kapaklı 2 mL'lik tüplere yerleştirildi. Bu tüpler tipik olarak serumun ayrılmasını ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmesinde kullanılarak kanın pıhtı kısımlarının ayrılmasını sağlayan bir jel tüpü içerir.

2. Kısım: Antikoagülan olarak EDTA içeren sıkı kapaklı 5 mL kan içeren bir tüpe 1,5 mL kan konulmasını, iyice karıştırılmasını ve ardından DNA ekstraksiyonu başlayana kadar tüpün -20°C'de tutulmasını içerir.

3.1.3 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Sıra	Kimyasallar	Şirket	Menşei
1	Amonyum asetat	BDH Kimyasal	İngiltere
2	Kloroform	Scharlab	İspanya
3	Sitrik asit	BDH Kimyasal	İngiltere
4	Di, sodyum etilen diamin tetra asetik asit Na_2 (EDTA)	BDH Kimyasal	İngiltere
5	Etanol		Hollanda
6	Glikoz	BDH Kimyasal	İngiltere
7	Hidroksit sodyum	BDH Kimyasal	İngiltere
8	İzo propanol	Scharlab	İspanya
9	Magnezyum klorür	BDH Kimyasal	İngiltere
10	SB tampon çözeltisi	BDH Kimyasal	İngiltere
11	Sodyum klorit	BDH Kimyasal	İngiltere
12	Sodyum sitrat	BDH Kimyasal	İngiltere
13	Sodyum dodesil sülfat	BDH Kimyasal	İngiltere
14	Sakaroz	BDH Kimyasal	İngiltere
15	Tris -HCL	Promega	ABD
16	Tri ton-×100	BDH Kimyasal	İngiltere
17	Agaroz	Promega	ABD
18	Boya yükleme	BDH Kimyasal	İngiltere
19	Red safe	Montreal biotech	Fransa
20	Fenol	Scharlab	İspanya
21	Premix	Promega	ABD
22	DNA Primeri	Cleaver	İngiltere

3.1.4 Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

Bu çalışmada kullanılan tüm araç ve gereçler Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar

Araç ve Gereçler	Şirket	Menşei
Santrifüj	Hettich	Almanya
Soğutma Santrifüjü	Erma	Tokyo
Derin dondurucu	Deko	Çin
E -Grafik	Erma	Tokyo
Elektroforez-güç kaynağı	Lab net Inter	Tayvan
ELISA Okuyucu	mindray	Çin
ELISA yıkayıcı	mindray	Çin
Jel elektroforezi	Lab net Inter. Inc	Tayvan
Ocak gözü ve karıştırıcı	Sartorius	Almanya
Kuluçka makinesi	Samix	Çin
Çikro santrifüj	Hettich	Almanya
Mikropipetler (5, 200, 1000)	Dragon	Çin
Mikrodalga	Memmert	Almanya
Nanodamla 2002/2000°C	Erma	Tokyo
Çalkalayıcı	Industrial group	Almanya
PH ölçer	Hanna Ins	İtalya
Portatif Otoklav	Arnoldand	İngiltere
Hassas terazi	Sartorius	Almanya
Termo döngüleyici	Applied bio systems	Singapur
Vorteks	Fanem	Brezilya
Su banyosu	Lab tech	Almanya
Su damıtma	LabTech	Kore

3.1.5 Kitler

Çalışmamızda kullanılan kitler Çizelge 3.3'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitler

Kitler	**Şirket**	**Menşei**
Anti CCP ELISA kit	Sunlong	Çin
PADI 4 ELISA kit	Sunlong	Çin

3.2 Yöntemler

3.2.1 Moleküler yöntemler

Tam kan örneğinden DNA ekstraksiyonu:

3.2.1.1 Çözeltilerin hazırlanması

- Kırmızı kan hücresi sitoliz solüsyonu: 0,01 M Tris-HCl pH 7,6, 320 mM sukroz, 50 mM $MgCl_2$ ve %1 Triton X 100. Tris-HCl 0,157 g, sükroz 10,95 g, $MgCL_2$ 0,476 g ve Triton X-100 üretmek için eritilir. Hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır ve çözelti 4°C veya altında saklanır.
- 0,01 M Tris-HCl, 20 mM Sodyum Sitrat, 20 mM EDTA ve %1'den (SDS) oluşan beyaz kan hücresi lizis solüsyonu hazırlanır, bunu yapmak için 80 mL damıtılmış suyu 0,157 g Tris-HCl, 0,75 g Na_2EDTA, 1 g SDS ve 0,588 g sodyum sitrat ile birleştirilir, pH 8'e ayarladıktan sonra, toplam 100 mL yapmak için 80 mL daha damıtılmış su eklenir.
- Fenol, kloroform ve izoamil karışımı (25:24:1) oranlarında reaktif olarak kullanılır.
- Amonyum asetat (7,5 M): 5782 g amonyum asetat 10 mL distile suda çözülür.
- Mutlak etanol (%100) ve 30 mL damıtılmış su birleştirilerek istenen konsantrasyonda etanol (%70) oluşturulur.
- Önceden 4°C'ye ısıtılmış kloroform

- 800 litre soğuk mutlak etanol (-20°C'de) ve 50 L amonyum asetatı yavaşça birleştirin. Çözelti durumunda, DNA bir iplik şeklini alabilir.
- Mikrofüj tüpünü 14,000 rpm'de ve 4°C'de 3 dakika döndürerek çökeltilir ve süpernatantı dikkatle atılır.
- Peleti yıkamak için 500 litre %70 etanol kullanılır daha sonra 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
- Tüp süpernatandan dikkatlice çıkarılır ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.
- 200 µL TE tampon içinde rehidrat edilir.
- DNA stoğu daha sonra (-20°C**)** kullanıma kadar dondurulur (Ali *et al.* 2008).

3.2.1.2 Agaroz jel elektroforezi

Bireyin moleküler ağırlığına ve jelin gözeneklerinin boyutuna göre, PCR işlemlerinde genomik DNA'nın tanımlanması için agaroz jel elektroforezi kullanılır. DNA parçalarının negatif bir yükü olduğundan, negatif elektrottan pozitif elektrota doğru akarlar.

3.2.1.3 Kullanılan çözeltiler

- 4 g SB çözülerek 10X tampon çözeltisi (sodyum hidroksit- borik asit) oluşturulur. 500 mL distile su ile 500 mL sodyum hidroksit, borik asit ilave edilerek karışımın pH'sı 8,5'e getirilir ve ardından 500 mL distile su ilave edilerek gerekli hacim elde edilir.
- Genomik DNA'yı tanımlamak için, 50 mL 1x SB içinde 0,5 g agaroz çözülerek %1'lik bir agaroz jel oluşturulur. Agaroz mikrodalgaya koyulur, kaynatılır ve ardından karışım 55°C'ye soğutulur.
- 0,25 g tampona bromofenol mavisi eklenir.

3.2.1.4 Jel elektroforez prosedürü

- Genomik DNA örneğini tutacak kuyucukları oluşturmak için jel elektroforez tarağı hazırlandı ve yerine bir jel tepsisi (10 x 10 cm) yerleştirildi.

- Agaroz dikkatli bir şekilde kalıba dökülüp oda sıcaklığında 10-15 dakika soğumaya bırakıldıktan sonra jele 3 µL Red Safe eklendi ve iyice karıştırıldı.
- Jel yüzeyinin bu tampon ile kaplandığı SB 1X okuyucu içeren tankta şablon jel ile sabitlenir.
- Tüplere 3 µL yükleme tamponu, 7 µL DNA numunesi eklenerek karıştırılır.

3.2.2 Enzim deneyi

Enzimi ölçmek için bir enzim bağlantılı ELISA test kiti olan Sandviç-ELISA yöntemi kullanıldı. Bu kit, belirli bir antikorla önceden kaplanmış bir Microelisa plakası içerir. Mikroelisa uyumlu kuyuları boşaltmak için standart veya numune ilaveleri yapıldı ve ardından ilgili antikor eklendi.

Kuyuların eklenmesinin ardından, her bir Microelisa plakası, hormona veya enzime özgü Yaban Turpu Peroksidazına (HRP) konjuge antikorlarla muamele edildi. Daha sonra her kuyuya TMB substratları eklendi.

Durdurma solüsyonu eklendiğinde, enzim ve HRP-konjuge antikoru içeren kuyucuklar önce mavi görünür, sonra sarıya döner, dalga boyu 450 nm'dir, müttefik spektrofotometriyi ölçmek için optik yoğunluk (OD) kullanılır.

3.2.3 Primerler

Entegre DNA Teknolojileri için, bir Amerikan şirketi primerleri liyofilize ederek bir toz haline getirmiştir. Primerler, belirlenen test tüplerinde kurutulduktan sonra oda sıcaklığında üretilir. Bu kullanım için stok solüsyonu hazırlamaya başlamak için, serbest damıtılmış su (PH=8,0) ve steril su içinde çözülür. Bu çözelti -20°C'lik bir sıcaklığı korumak için uygulanır ve daha sonra uygun Pmol/µL konsantrasyonlarını vermek üzere damıtılmış su (PH=8,0) ve steril su ile seyreltilir (Çizelge 3.4) (Çizelge 3.5) (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.4 PADI4 rs11203366 primer dizisi

Primer	Nükleotid dizileri	Sayı
FO	5′-CTGGGAGAGCCATGG C -3′	16
RO	5′-GTCGCCTGTGCTACCA -3′	16
F1	5′-TGCATATTGGCCCCG -3′	15
F1	5′-ATTTCTTCTTGGCTGGAGGTCT -3′	22

Çizelge 3.5 PADI4 rs11203367 primer dizisi

Primer	Nükleotid dizileri	Sayı
FO	5′-CTGCCCCTGAGGACTGCAC -3′	19
RO	5′-GTGGATCACGGCAGGACAGA -3′	20
F1	5′-GGTGACCCTGACGATGAACGT -3′	21
F1	5′-GCCTGTGCTACCACTGGACG -3′	21

Çizelge 3.6 PADI4 rs874881 primer dizisi

Primer	Nükleotid dizileri	Sayı
FO	5′-GCTTTCCCTCCATTCCCATC -3′	20
RO	5′-ACTCCCAGATGTCTGACTGGCT -3′	22
F1	5′-CAAAGCTCTACTCTACCTCACGGG-3′	24
F1	5′-TGGTTGTCACTTACCCAGCG -3′	20

3.2.4 PCR-ARMS yöntemi

1. PCR-ARMS mikrotüpleri, DNA amplifikasyon reaksiyonunu çalıştırmak için ısı döngüleyiciye eklendi (Çizelge 3.7) (Çizelge 3.8) (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.7 rs11203366 amplifikasyonunu gösteren program

No	Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	İlk denatürasyon	95	30 saniye	43
2	Denatürasyon	95	1 dakika	30
	Tavlama	57	30 saniye	
	Eklenti	72	2 dakika	
3	Son uzatma	72	10 dakika	1

Çizelge 3.8 rs11203367 amplifikasyonunu gösteren program

No	Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	İlk denatürasyon	95	30 saniye	43
2	Denatürasyon	59	1 dakika	30
	Tavlama	57	30 saniye	
	Eklenti	72	2 dakika	
3	Son uzatma	72	10 dakika	1

Çizelge 3.9 rs874881 amplifikasyonunu gösteren program

No	Aşamalar	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	İlk denatürasyon	61,5	5 dakika	1
2	Denatürasyon	94	1dakika	35
	Tavlama	59	1dakika	
	Eklenti	72	2 dakika	
3	Son uzatma	72	10 dakika	1

2. Önce numuneler termocycler'dan çıkarılır ve reaksiyon süresinin bitiminden hemen sonra her bir tüpten 5 µL çekilir. 80 mL'de (SP 1X) 1,6 g %2 konsantrasyonunda önceden hazırlanmış agaroz jel deliklerine yüklenir, tepsi boyutu 15 x 10 cm'dir.

3. Amplifiye edilen DNA, elektroforez cihazı çalıştırılarak iki aşamada transfer edilir

- 1. Aşama (50 Volt+40 mA+10 dk).
- 2. Aşama (80 Volt+70 mA+60 dk).

4. Dizüstü bilgisayara bağlı bir E-Graph cihazı aracılığıyla jel de görüntülenir ve görüntüler kaydedilir.

3.3 İstatistiksel analiz

Çalışma sonunda elde edilen veriler SPSS paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Rs11203366 (163 A/G), rs11203367 (245C>T) ve rs874881

(335C>G) için alelik tekrar sıklığı aşağıdaki denklem kullanılarak tahmin edilmiştir (Şekil 3.1).

İlk alelin frekansı=p

İkinci alelin frekansı=q

$$freq.\ first\ allele = \frac{2(Num.\ of\ identical\ genotypes) + Num.\ of\ hybrid}{the\ total\ number \times 2}$$

$$frequency\ of\ the\ second\ allele = 1 - Repeat\ the\ first\ allele$$

For genotypes:

$$Freq.\ the\ genotype\ viewer = \frac{Number\ of\ genotype}{the\ total\ numbe}$$

Şekil 3.1 İstatiksel işlem

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Numunelerin Özellikleri

Çizelge 4.1'de çalışmaya katılan 64 hasta ve 32 kontrol grubuna ait genel özellikler bulunmaktadır.

Çizelge 4.1 İncelenen popülasyonların genel özellikleri

Numunelerin özellikleri		**Hasta grubu**	**Kontrol grubu**
Yaş (yıl)	25-30 31-35	17 (%26,57) 47 (%73,43)	22 (%68,75) 10 (%31,25)
		** Ki-Kare = 15.741 P-Değeri = 0,0006	
Cinsiyet	Kadın Erkek	56 (%87,5) 8 (%12,5)	12 (%37,5) 20 (%62,5)
		** Ki-Kare = 25,815 P-Değeri = 0,0008	

Çizelge 4.1'de RA hastalarının yaşlarına göre oranlarını iki kategoriye ayırarak göstermektedir. Çalışmanın istatistiksel analizin de her iki yaş grubu ve cinsiyetler arasında RA insidansında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Anlamlı farklılıkları belirlemek için ki-kare (X^2) analizi yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık (*) olasılık değeri (P-değeri <0,010) olarak tanımlanırken, istatistiksel anlamsızlık (P-değeri> 0,010) olarak belirlenmiştir. Her iki RA hasta yaş grubu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, belirgin farklar bulunmuştur. RA hastaları, 31-35 yaş grubunda %73,43 iken, kontrol gruplarında 25-30 yaş grubunda %26,57 olarak tespit edilmiştir. RA hastaları, 25-30 yaş kontrol grubunda %68,75 iken, 31-35 grubu kontrol grubunda %31,25 olarak belirlenmiştir. Ayrıca hasta ve kontrol gruplarının tüm yaş grupları arasında anlamlı farklar bulunmuştur.

2017 yılında, (Kato *et al.* 2017), RA başlangıç yaşının 2002–2003'te 55,8, 2007–2008'de 57, 2012–2013'te 59,9'a yükseldiğini bulmuşlardır. En yüksek oran 2002-2003'teki 50-59 yaş grubu ve 2012-2013'teki 60-69 yaş grubunda tespit edilmiştir. (Tehlirian and Bathon

2008) tarafından yapılan bir çalışmada, hastalık başlangıcının herhangi bir yaşta ortaya çıkabileceği ve en yaygın olarak 40 ile 50 yaşları arasında olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda cinsiyete bağlı sonuçları incelediğimizde, yatan hasta gruplarında kadın oranında %87,5 artış görülürken, erkeklerde %12,5 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Cinsiyetle ilgili bu sonuç, Romatoid artritin kadınlarda erkeklerden daha yaygın olduğunu (3:1 oran) gösteren (Klein and Morgan 2020)'ın sonuçlarıyla uyumludur. Epidemiyolojik verileri kullanan (Favalli *et al.* 2019), yaşa bağlı olarak romatoid artritli kadınlarda prevalansın erkeklere göre üç kat daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Her iki cinsiyet için insidans oranına bakacak olursak, kadınlarda yaşla birlikte kademeli olarak arttığı, ancak erkeklerde 30-50'li yıllarda nispeten sabit kaldığı ve bundan sonra tekrar yükselmeye başladığı görülmektedir. Özellikle romatoid artrit, 10-40'lı yaşlara kadar olan kadınlarda üç kat daha sık görülür, 55 ile 65 yaş grubunda 2:1 oranına düşer ve sonunda 65 yaş üstü erişkinlerde tekrar artar. Genetik ve hormonal değişimler de dahil olmak üzere çok sayıda değişkenin, kadınlarda romatoid artrit prevalansında etkili olduğu düşünülmektedir.

4.2 Anti-Sitrüline Protein (Anti CCP) ve Peptidil Arginin Deiminaz 4 (PADI4) Konsantrasyonunun Hesaplanması

Çizelge 4.2, romatoid artrit (RA) hastaları ile kontrol grubu arasındaki anti-CCP konsantrasyonlarının karşılaştırması bulunmaktadır. Buna göre, RA hastalığı olanlarda anti-CCP düzeyinin ortalama ± standart sapması 8,308±0,935 U/mL iken, kontrol grubunda 7,367±1,032 U/mL olarak görülmektedir. Bu sonuçlardan, anti-CCP düzeyinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında RA hasta grubunda 0,01 ≥p önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Ayrıca RA hastalığı olanlarda PADI4 düzeyinin ortalama ± standart sapması 11,124±1,211 IU/L iken, kontrol grubunda 6,021±2,767 IU/L olarak karşımıza çıkmaktadır. Elde edilen bu sonuçlardan, PADI4 seviyesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, RA hasta grubunda 0,01≥p anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 Hasta ve kontrol grubunda CCP VE PADI4 seviyelerinin karşılaştırılması

Parametreler	Hasta grubu	Kontrol grubu	*P* değeri
	Ortalama ± SS	Ortalama ± SS	
CCP U/mL	8,308±0,935	7,367±1,032	≤0,01 **
PADI4 IU/L	11,124±1,211	6,021±2,767	≤0,01 **

2019 yılında, (Hussein *et al.* 2019) yaptıkları çalışmada, romatoid artritli hastalarda kontrol grubuna göre (8,4±4,4 ng/mL ve 156±31 pg/mL) önemli ölçüde daha yüksek PADI4 (532,9±240,9 pg/mL) ve Anti-CCP (129,3±74,8 ng/mL) seviyeleri olduğunu tespit etmiştir.

Serum PADI4 seviyeleri ve anti-CCP seviyelerinin romatoid artritteki rolünü değerlendirdiğimizde, PADI4'ün serum seviyeleri RA hastalarında, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuç önceki çalışmalardan elde edilen bulgularla uyumluluk göstermektedir (Umeda *et al.* 2016). Bunlara ek olarak, insan eozinofillerinde ve iflamatuar bölgelerdeki spesifik nötrofillerde ve ayrıca romatoid artritli kişilerin sinovyal dokularında ve sinoviyal bağışıklık hücrelerinde PADI4 bulunmaktadır (Chang *et al.* 2005). RA'da plazma PADI4'ün nereden geldiği belirsizdir, ancak dokulardan veya hücrelerden ekstravazasyonun hastalığın patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (Basu *et al.* 2011). Ayrıca RA tanısında anti-CCP'nin yüksek özgüllüğünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Manivelavan ve Vijayasamundeeswari 2012).

Bununla birlikte, (Chang *et al.* 2016), hem RF hem de anti-CCP negatif olduğunda hastalık için, RA teşhisinde diğer biyobelirteçlerin araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur. Başka bir çalışmada, anti-CCP'nin romatoid artrit teşhisi için %60 ile %83 arasında değişen bir duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir. Bildirilen sonuçların çok çeşitli olması, test edilen hastaların özelliklerindeki farklılıklar ve kullanılan kesme değerleri ile açıklanabilir (Spengler *et al.* 2015).

Peptidil arginin deiminaz, sitrulinin (PADI) arginin protein kalıntısında bulunan enzimdir. PADI2, 3 ve 4, bu enzimin RA sinovyumunda ifade edilen üç izoformudur,

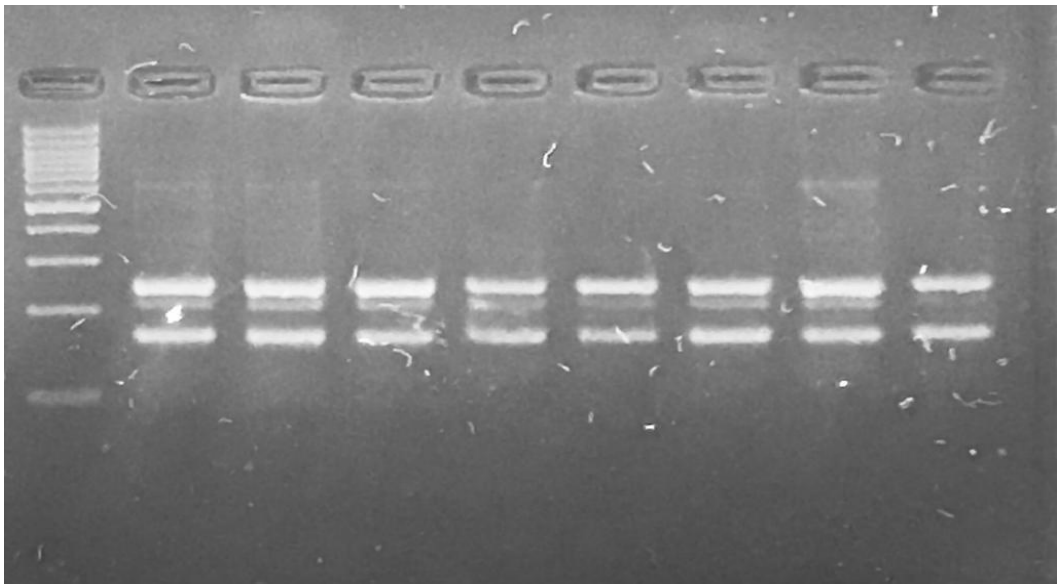
PADI4 ise hasta antikorları tarafından en seçici şekilde bağlanan izoformdur (Blachère *et al.* 2017).

PADI4, bir bağışıklık tepkisi oluşturan yeni antijenlerin üretimi, RA'nın patogenezi ve daha önce genetik temizliğe tabi tutulmuş kişilerde bir hastalık döngüsünün geliştirilmesi yoluyla çok önemli bir rol oynar (Witalison *et al.* 2015).

4.3 Moleküler Deneyler

4.3.1 Çeşitli genotiplerin sıklığı ve PADI4 geninin rs11203366 (163A/G) polimorfizmi için alellik görüntüleme yüzdesi

Tetra ARMS-PCR tekniğinin sonuçlarına göre (rs11203366 163 A/G), çalışma grubu heterozigot genotipi taşıdığı için hasta grubu ile sağlıklı olanlar arasında fark ortaya çıkmamıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 RA Hastaları ve kontrol gruplarında PADI4 geninin rs11203366 (163A/G) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü

4.3.2 Çeşitli genotiplerin sıklığı ve PADI4 geninin rs11203367 (245C>T) polimorfizmi için alellik görüntüleme yüzdesi

Çizelge 4.3'te, PADI4'ün rs11203367 C/T geninin polimorfizminin PCR-ARMS analizinin üç genotip (CC, CT, TT) ortaya çıkardığını gösterilmektedir. Hem RA hasta grubunda hem de kontrol grubunda genotiplerin alellik frekanslarını ve genotiplere sahip hasta sayısı gösterilmiştir. Ayrıca, Hardy-Weinberg denklemine göre genotipler dağıtılmıştır.

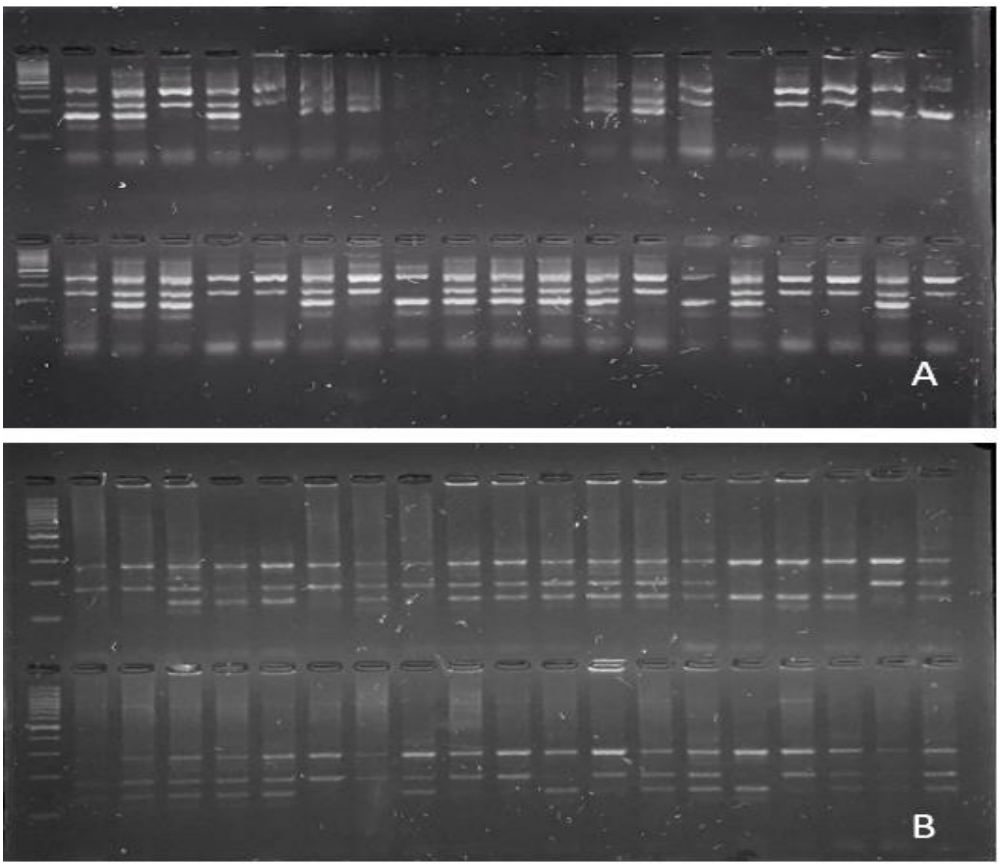
Çizelge 4.3 PADI4 geni rs11203367 polimorfizminin farklı genotiplerinin alel görüntüleme yüzdesi

Genotipler	Hasta grubu		Kontrol grubu		OR	(%95 Cl)	*P* değeri
	Sayı	%	Sayı	%			
CC	28	43,8	32	100	1 Ref.	-	-
CT	31	48,4	0	0	17,842	4,202-228,020	0,003 *
TT	5	7,8	0	0	12.543	0,664-236,917	0,091
Aleller	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**	**OR**	**(%95 Cl)**	***P* değeri**
C	87	67,96	64	100	1 Ref.	-	0,004
T	41	32,04	0	0	16,182	3,694-101,195	

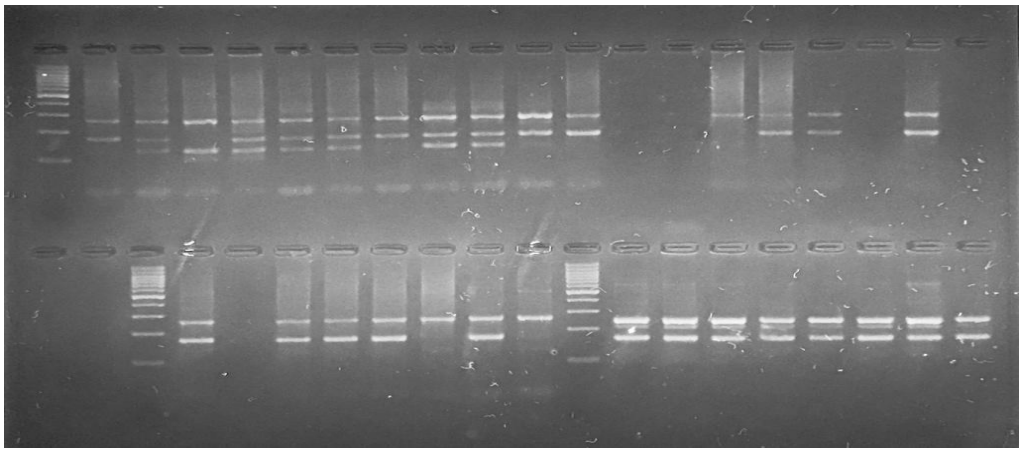
RA'lı hastalar için sonuçlar, heterozigot CT genotipinin tekrar oranının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, %48,4'lük bir yüzde ile en yüksek olduğunu göstermiştir. Normal genotip oranının %100 olduğu kontrol grubunun aksine, normal CC genotip yüzdesi %43,8 ile en düşüktür. Kontrol grubunun %0 gözlem oranı ile karşılaştırıldığında, hasta grubunun mutant TT genotipi için %7,8 gözlem oranına sahip olduğu görülmektedir. Alellerin sıklığına ilişkin bulgulara göre, hasta grubun mutant T aleli (kontrol grubundaki %0'a kıyasla %32,04) ve normal alel için (%100'e kıyasla %67,96) yüksek bir kontrol yüzdesine sahiptir.

Hastaların TT genotipi OR=12,543 ve (%95 CI=0,664-236,917) olup, T alelinin OR değeri 16,182 düşüktür (%95 CI=3,694-101,195). Elde edilen sonuçlara göre olasılık TT,

CT ve alel T genotipleri, romatoid artrit için risk faktörü olarak görülmektedir (Şekil 4.2) (Şekil 4.3) (Şekil 4.4).



Şekil 4.2 RA hasta grubu için PADI4 geninin rs11203367 (245 C>T) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü



Şekil 4.3 RA kontrol grubu için PADI4 geninin rs11203367 (245C>T) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü

4.3.3 Çeşitli genotiplerin sıklığı ve PADI4 geninin rs874881 (335 C>G) polimorfizmi için alellik görüntüleme yüzdesi

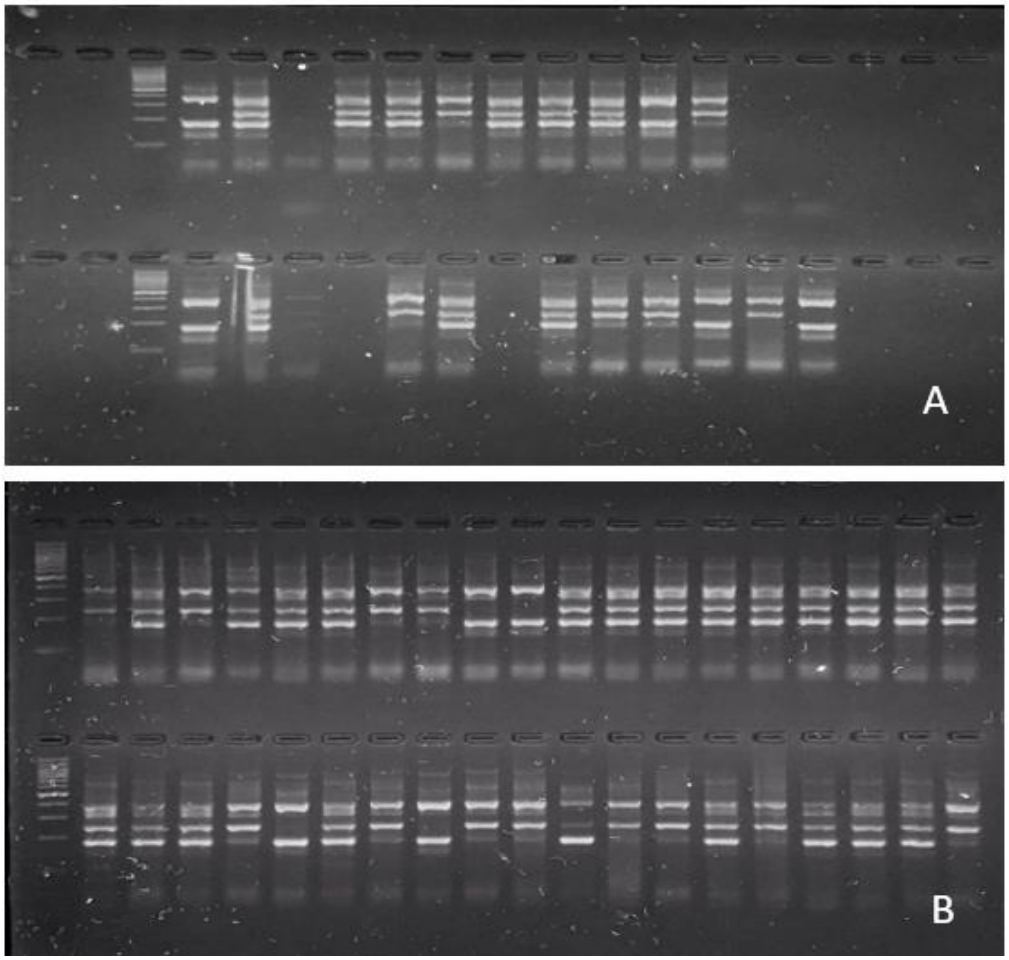
PADI4 geninin rs874881 C/G (CC, CG ve GG) polimorfizmi için yapılan PCR-ARMS araştırmasında, üç genotip (CC, CG ve GG) keşfedilmiştir. Hem kontrol grubunda hem de RA hasta grubunda genotip alelik frekanslarını ve genotiplere sahip hasta sayısı belirtilmiştir. Bunlara ek olarak, genotipler Hardy-Weinberg denklem yasasına göre dağılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 PADI4 geni rs874881polimorfizminin farklı genotiplerinin alel görüntüleme yüzdesi

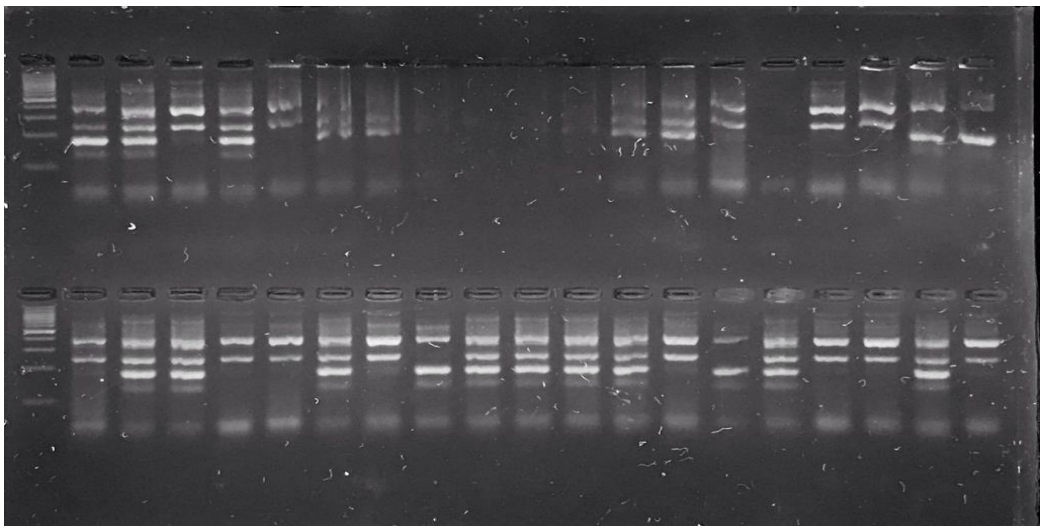
	Hasta grubu		**Kontrol grubu**				
Genotipler	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**	**OR**	**(%95 Cl)**	***P* değeri**
CC	16	25	13	40,6	1 Ref.	-	-
CG	39	60,9	15	46,9	**2,112**	0,8223-5,427	0,120
GG	9	14.1	4	12.5	**1,828**	0,456- 7,315	0,393
Aleller	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**	**OR**	**(%95 Cl)**	***P* değeri**
C	71	55,46	41	64,1	1 Ref.	-	0,255
G	57	44,54	23	35,9	1,431	0,771- 2,655	

Heterozigot CG genotipi RA hastalarında %60,9, kontrol grubundan ise %46,9 ile daha düşük bir tekrar oranına sahiptir. Normal genotip CC yüzdesi ise RA hastalarında %25, kontrol grubunda ise %40,6 olarak tespit edilmiştir. Mutant GG genotipi ise, kontrol grubunda %12,5, hasta grubunda %14,1 olarak belirlenmiştir. Alel frekansı açısından, bulgular, hasta grubunda mutant G aleli gözlemleme olasılığının daha yüksek (%44,54) iken kontrol grubunda daha düşüktür (%35,9). Normal C aleli gözlemleme olasılığına bakacak olursak kontrol grubunda daha yüksek (%64,1) olduğu tespit edilmiştir.

Hastaların bir GG genotipi OR=1,828 ve (%95 CI=0,456-7,315) olup, G alelinin OR değeri 1,431 ile daha (%95 CI=0,771-2,655) düşüktür. Elde edilen sonuçlara göre olasılık GG genotipi ve G aleli romatoid artrit için risk faktörü olarak görülmektedir (Şekil 4.4) (Şekil 4.5).



Şekil 4.4 RA Hasta grubu için PADI4 geninin rs874881 (335 C>G) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü



Şekil 4.5 RA kontrol grubu için PADI4 geninin rs874881 (335 C>G) polimorfizmindeki PCR-ARMS görüntüsü

Elde ettiğimiz bu sonuçlar, (Khadim and Al-Kazaz 2022) tarafından Iraklı bireylerin romatoid artrit duyarlılığında PADI4 geninin rs11203367 mutasyonunun önemini vurgulayan çalışması ile uyumluluk göstermiştir. Ayrıca (Chen *et al.* 2011) tarafından PADI4 polimorfizminin Han Çin popülasyonlarında RA duyarlılığında önemli bir rolü olduğu sonucu ile de bağantılıdır.

Birçok olası nedeni olan karmaşık bir hastalık olan romatoid artrit duyarlılığında genetik faktörlerin önemli bir etkisi vardır. PADI4 geni, çeşitli popülasyonlarda önemli bir RA duyarlılık odağı olarak tanımlanmıştır. PADI4, ilk olarak Japon ve diğer Asya popülasyonlarında daha sonra Avrupa ve Latin Amerika popülasyonlarında MHC olmayan bir RA risk lokusu olarak kabul edilmiştir (Ishikawa and Terao 2020, Aslam *et al.* 2020). PADI4 geninin, Asya gruplarında RA ile güçlü bir bağlantısı olsa da bu bağlantı Kafkas popülasyonlarında tespit edilememiştir. Bu durum gruplardaki çevresel koşulların farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır (Saad *et al.* 2016). Elde edilen bu sonuçlar, Kore (Kang *et al.* 2006), Almanya (Hoppe *et al.* 2006), Fransa (Gandjbakhch *et al.* 2009), Avrupa (Hou *et al.* 2013) ve Meksika'da (Baños-Hernández *et al.* 2017, Guzmán-Guzmán *et al.* 2015) yapılan çalışmaların sonuçları ile doğrulanmıştır. Çin ve İran popülasyonları üzerinde benzer araştırmalar yapılmış olsa da bu çalışmanın bulguları (Chen *et al.* 2011) bulgularıyla çelişmektedir (Shamsian *et al.* 2016). Genetik korelasyonlara ek olarak, hastalığın şiddeti, etnik gruplardaki farklılıklar ve genetik geçmiş gibi klinik özellikler hastalığın seyrini etkiler (Baños-Hernández *et al.* 2017). Yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, PADI4 polimorfizmi RA hastalığı için önemli bir risk faktörüdür. (Harris *et al.* 2008) tarafından yapılan bir araştırmada, eş anlamlı olmayan üç SNP (rs11203366, rs11203367 ve rs874881)'nin RA gelişme riskini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca cinsiyet sonuçlarına göre, 1019 RA hastası ve 907 kontrolün meta-analizinde, PADI4 gen polimorfizmi (rs11203367) sadece erkeklerde RA ile büyük ölçüde ilişkili çıkmıştır (Kochi *et al.* 2011). Daha da önemlisi, (Baños-Hernández *et al.* 2017), GTG haplotipi ile rs11203367 düzeyinde fonksiyonel bozulma arasında bir eğilim bulmuştur. PADI4 SNP'ler, Hint popülasyonunda RA ile çok değişken bir korelasyona sahiptir (Panati *et al.* 2012). PADI4 rs11203367 alelinin sıklığı, Ankilozan Spondilit (AS) hastaları ile Çin Han topluluğundaki kontroller arasında önemli ölçüde farklılık oluşturmamıştır (Chen *et al.* 2010). (Chenou *et al.* 2017) tarafından yapılan araştırmaya

göre bacak ülserleri (LU), vasküler oklüzyon krizleri (VOC) ve inme PADI4 rs11203367 polimorfizmi ile bağlantılı değildir. İran'da beş tek nükleotit polimorfizminin (SNP'ler; rs874881, rs11203366, rs2240340, rs11203367 ve rs11203368) lupus nefriti (LN) ve hipertansiyon gelişme riskini arttırdığı ortaya çıkmıştır. Japon popülasyonunda romatoid artrit ile bağlantılı olan PADI4 geni üzerinde daha fazla SNP bulunmuştur (Ikari *et al.* 2005). Avrupalılarda ve Asyalılarda PADI4'ün RA ile farklı ilişkileri genetik değişkenlik ile açıklanabilir (Kang *et al.* 2006). RA hastalarında Padı4 ekspresyonunun önemli ölçüde daha fazla olduğu ve bu yükselmenin (Fan *et al.* 2008) tarafından Çin nüfusunda incelenen dört SNP'nin (rs11203366, rs11203367, rs874881, rs1748033) alelleri ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde, Irak'ta romatoid artritli hastaların çoğunlukla kadın olduğu ve ortalama yaşlarının orta yaş olduğu bulunmuştur. PADI4 ve anti-CCP kan seviyeleri, Romatoid artritli hastalarda sağlıklı kontrol grubundan daha yüksek belirlenmiştir. Araştırma grubunun lokasyondaki heterozigot genotip (rs11203366 163 A/G), hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark oluşturmamıştır. PADI4 geninin rs11203367 ve rs874881 alel dağılımına ilişkin mevcut bulgularında, alelin bir risk aleli olduğunu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç, Irak popülasyonunda PADI4 geni ile RA arasında güçlü, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğunu kanıtlamıştır.

Ayrıca araştırılan genin promotör bölgesinin yanı sıra ekspresyonu etkileyebilecek herhangi bir mutasyon veya polimorfizmin olabileceği düşüncesi nedeniyle daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Romatoid artrit hastalarında çevresel ve genetik faktörler de dahil olmak üzere çoğu faktöre daha fazla dikkat edilmesi, PADI 4 ve anti-CCP testlerinin RA hastalarının tanı ve takibinde kullanılması, PADI 4 ve anti-CCP hakkında Irak'ın diğer bölgelerinde daha fazla örnek kullanılarak araştırma yapılması ve daha fazla RA hastasının genlerinin gelecekteki çalışmalar için araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Ad'hiah, A. H. 2013. Assessment of urinary tract infection and cytokine (IL-2, IL-4 and IL-17A) serum levels in iraqi samples of systemic autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and systemic lupus erythematosus) patients. IIUM Medical Journal Malaysia, 12(1).

Aggarwal, R., Liao, K., Nair, R., Ringold, S., & Costenbader, K. H. 2009. Anti-citrullinated peptide antibody (ACPA) assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism, 61(11): 1472.

Aletaha, D., & Smolen, J. S. 2018. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review. Jama, 320(13): 1360-1372.

Ali, S. M., Mahnaz, S., & Mahmood, T. 2008. Rapid genomic DNA extraction (RGDE). Forensic science International: Genetics Supplement Series, 1(1): 63-65.

Andrade, F., Darrah, E., Gucek, M., Cole, R. N., Rosen, A., & Zhu, X. 2010. Autocitrullination of human peptidyl arginine deiminase type 4 regulates protein citrullination during cell activation. Arthritis & Rheumatism, 62(6): 1630-1640.

Ansar, W., & Ghosh, S. 2013. C-reactive protein and the biology of disease. Immunologic Research, 56(1): 131-142.

Anzilotti, C., Pratesi, F., Tommasi, C., & Migliorini, P. 2010. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. Autoimmunity Reviews, 9(3): 158-160.

Arnoux, F., Mariot, C., Peen, E., Lambert, N. C., Balandraud, N., Roudier, J., & Auger, I. 2017. Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(47): E10169-E10177.

Aslam, M. M., John, P., Fan, K. H., Bhatti, A., Aziz, W., Ahmed, B., & Kamboh, M. I. 2020. Investigating the GWAS-implicated loci for rheumatoid arthritis in the Pakistani population. Disease Markers, 2020.

Aslani, S., Rezaei, R., Jamshidi, A., & Mahmoudi, M. 2018. Genetic and epigenetic etiology of autoimmune diseases: lessons from twin studies. Rheumatology Research, 3(2): 45-57.

Assohou-Luty, C., Raijmakers, R., Benckhuijsen, W. E., Stammen-Vogelzangs, J., de Ru, A., van Veelen, P. A., & Pruijn, G. J. 2014. The human peptidylarginine deiminases

type 2 and type 4 have distinct substrate specificities. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1844(4): 829-836.

Auger, I., Martin, M., Balandraud, N., & Roudier, J. 2010. Rheumatoid arthritis–specific autoantibodies to peptidyl arginine deiminase type 4 inhibit citrullination of fibrinogen. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 62(1): 126-131.

Avouac, J., Gossec, L., & Dougados, M. 2006. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. Annals of the Rheumatic Diseases, 65(7): 845-851.

Baños-Hernández, C. J., Navarro-Zarza, J. E., Parra-Rojas, I., Vázquez-Villamar, M., Padilla-Gutiérrez, J. R., Valle, Y., & Muñoz-Valle, J. F. 2017. PADI4 polymorphisms and the functional haplotype are associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility: A replication study in a Southern Mexican population. Human Immunology, 78(9): 553-558.

Basu, P. S., Majhi, R., Ghosal, S., & Batabyal, S. K. 2011. Peptidyl-arginine deiminase: an additional marker of rheumatoid arthritis. Clinical Laboratory, 57(11-12): 1021-1025.

Bawadekar, M., Shim, D., Johnson, C. J., Warner, T. F., Rebernick, R., Damgaard, D., & 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.

Björk, A., Mofors, J., & Wahren-Herlenius, M. 2020. Environmental factors in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. Journal of Internal Medicine, 287(5): 475-492.

Blachère, N. E., Parveen, S., Frank, M. O., Dill, B. D., Molina, H., & Orange, D. E. 2017. High-titer rheumatoid arthritis antibodies preferentially bind fibrinogen citrullinated by peptidylarginine deiminase 4. Arthritis & Rheumatology, 69(5): 986-995.

Breda, L., Nozzi, M., De Sanctis, S., and Chiarelli, F. 2010. Laboratory tests in the diagnosis and follow-up of pediatric rheumatic diseases: an update. In Seminars in Arthritis and Rheumatism 40 (1): 53-72.

Burr, M. L., Naseem, H., Hinks, A., Eyre, S., Gibbons, L. J., Bowes, J., & BIRAC Consortium. 2010. PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. Annals of the Rheumatic Diseases, 69(4): 666-670.

Buzatu, C., & Moots, R. J. 2019. Measuring disease activity and response to treatment in rheumatoid arthritis. Expert Review of Clinical Immunology, 15(2): 135-145.

Cappelli, L. C., Konig, M. F., Gelber, A. C., Bingham, C. O., & Darrah, E. 2018. Smoking is not linked to the development of anti-peptidylarginine deiminase 4 autoantibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy, 20(1): 1-8.

Caspi, D., Anouk, M., Golan, I., Paran, D., Kaufman, I., Wigler, I., & Elkayam, O. 2006. Synovial fluid levels of anti–cyclic citrullinated peptide antibodies and IgA rheumatoid factor in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and osteoarthritis. Arthritis Care & Research: Official Journal of the American College of Rheumatology, 55(1): 53-56.

Chang, P. Y., Yang, C. T., Cheng, C. H., & Yu, K. H. 2016. Diagnostic performance of anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis. International Journal of Rheumatic Diseases, 19(9): 880-886.

Chang, X. T., Yamada, R., Suzuki, A., Sawada, T., Yoshino, S., Tokuhiro, S., & Yamamoto, K. 2005. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. Rheumatology, 44(1): 40-50.

Chen, R., Wei, Y., Cai, Q., Duan, S., Lin, J., Fang, M., & Sun, S. 2010. PADI4 gene polymorphism is not associated with ankylosing spondylitis in Chinese Han population. Scandinavian Journal of Immunology, 72(5): 449-453.

Chen, R., Wei, Y., Cai, Q., Duan, S., Ren, D., Shen, J., & Sun, S. 2011. The PADI4 gene does not contribute to genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Chinese Han population. Rheumatology International, 31(12): 1631-1634.

Chenou, F., Hounkpe, B. W., Albuquerque, D. M. D., Domingos, I. D. F., Araujo, A. D. S., Cavalcanti Bezerra, M. A., & Santos, M. N. N. 2017. PADI4 gene polymorphism as a risk factor for acute chest syndrome in sickle cell anemia patients. Basic and Translational Science, 2017(7): 120-954

Cherrington, B. D., Zhang, X., McElwee, J. L., Morency, E., Anguish, L. J., & Coonrod, S. A. 2012. Potential role for PAD2 in gene regulation in breast cancer cells. PloS one, 7(7): e41242.

Choy, E. H., & Calabrese, L. H. 2018. Neuroendocrine and neurophysiological effects of interleukin 6 in rheumatoid arthritis. Rheumatology, 57(11): 1885-1895.

Corsiero, E., Pratesi, F., Prediletto, E., Bombardieri, M., & Migliorini, P. 2016. NETosis as source of autoantigens in rheumatoid arthritis. Frontiers in Immunology, 7: 485.

Crouthamel, M., Quattrocchi, E., Watts, S., Wang, S., Berry, P., Garcia-Gancedo, L., & Williams, R. E. 2018. Using a ResearchKit smartphone app to collect rheumatoid arthritis symptoms from real-world participants: feasibility study. JMIR mHealth and uHealth, 6(9): e9656.

Damgaard, D., Bawadekar, M., Senolt, L., Stensballe, A., Shelef, M. A., & Nielsen, C. H. 2018. Relative efficiencies of peptidylarginine deiminase 2 and 4 in generating target sites for anti-citrullinated protein antibodies in fibrinogen, alpha-enolase and histone H3. PLoS One, 13(8): e0203214.

Darrah, E., Giles, J. T., Davis, R. L., Naik, P., Wang, H., Konig, M. F., & Andrade, F. 2018. Autoantibodies to peptidylarginine deiminase 2 are associated with less severe disease in rheumatoid arthritis. Frontiers in Immunology, 9: 2696.

Darrah, E., Giles, J. T., Ols, M. L., Bull, H. G., Andrade, F., & Rosen, A. 2013. Erosive rheumatoid arthritis is associated with antibodies that activate PAD4 by increasing calcium sensitivity. Science Translational Medicine, 5(186): 186ra65-186ra65.

Darrah, E., Rosen, A., Giles, J. T., & Andrade, F. 2012. Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 71(1): 92-98.

Deane, K. D., Demoruelle, M. K., Kelmenson, L. B., Kuhn, K. A., Norris, J. M., & Holers, V. M. 2017. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 31(1): 3-18.

Dieterich, W., Schink, M., & Zopf, Y. 2018. Microbiota in the gastrointestinal tract. Medical Sciences, 6(4): 116.

Ebel, A. V., & O'Dell, J. R. 2021. Clinical features, diagnosis, and treatment of rheumatoid arthritis. Physician Assistant Clinics, 6(1): 41-60.

Elkayam, O., Segal, R., Lidgi, M., & Caspi, D. 2006. Positive anti-cyclic citrullinated proteins and rheumatoid factor during active lung tuberculosis. Annals of the Rheumatic Diseases, 65(8): 1110-1112.

Elliott, S. E., Kongpachith, S., Lingampalli, N., Adamska, J. Z., Cannon, B. J., Mao, R., & Robinson, W. H. 2018. Affinity maturation drives epitope spreading and generation of proinflammatory anti–citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatology, 70(12): 1946-1958.

Fan, L. Y., Wang, W. J., Wang, Q., Zong, M., Yang, L., Zhang, H., & Han, J. 2008. A functional haplotype and expression of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Chinese. Tissue Antigens, 72(5): 469-473.

Fang, P., Li, X., Dai, J., Cole, L., Camacho, J. A., Zhang, Y., & Wang, H. 2018. Immune cell subset differentiation and tissue inflammation. Journal of Hematology & Oncology, 11(1): 1-22.

Fang, Q., Zhou, C., & Nandakumar, K. S. 2020. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis. Mediators of Inflammation, 2020(1); 1-9.

Favalli, E. G., Biggioggero, M., Crotti, C., Becciolini, A., Raimondo, M. G., & Meroni, P. L. 2019. Sex and management of rheumatoid arthritis. Clinical Reviews in Allergy & Immunology, 56(3): 333-345.

Figueiredo, C. P., Perez, M. O., Sales, L. P., Medeiros, A. C., Caparbo, V. F., & Pereira, R. M. 2021. Bone erosion in the 2nd metacarpophalangeal head: association with its bone mineral density by HR-pQCT in rheumatoid arthritis patients. BMC Musculoskeletal Disorders, 22(1): 1-8.

Figus, F. A., Piga, M., Azzolin, I., McConnell, R., & Iagnocco, A. 2021. Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. Autoimmunity Reviews, 20(4): 102776.

Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al Badine, R., Méchin, M. C., & Serre, G. 2007. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 56(11): 3541-3553.

Gandjbakhch, F., Fajardy, I., Ferré, B., Dubucquoi, S., Flipo, R. M., Roger, N., & Solau-Gervais, E. 2009. A functional haplotype of PADI4 gene in rheumatoid arthritis: positive correlation in a French population. The Journal of Rheumatology, 36(5): 881-886.

Genovese, M. C., Kalunian, K., Gottenberg, J. E., Mozaffarian, N., Bartok, B., Matzkies, F., & Takeuchi, T. 2019. Effect of filgotinib vs placebo on clinical response in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis refractory to disease-modifying antirheumatic drug therapy: the FINCH 2 randomized clinical trial. Jama, 322(4): 315-325.

Gianchecchi, E., Delfino, D. V., & Fierabracci, A. 2018. NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses. Autoimmunity Reviews, 17(2): 142-154.

Guo, Q., Wang, Y., Xu, D., Nossent, J., Pavlos, N. J., & Xu, J. 2018. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. Bone Research, 6(1): 1-14.

Guzmán-Guzmán, I. P., Reyes-Castillo, Z., Muñoz-Barrios, S., Ruiz-Noa, Y., Martínez-Bonilla, G. E., Parra-Rojas, I., & Muñoz-Valle, J. F. 2015. Polymorphisms and functional haplotype in PADI4: further evidence for contribution on rheumatoid arthritis susceptibility and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in a western Mexican population. Immunology Letters, 163(2): 214-220.

Han, Y., Pang, X., & Pi, G. 2021. Biomimetic and bioinspired intervention strategies for the treatment of rheumatoid arthritis. Advanced Functional Materials, 31(38): 2104640.

Harris, M. L., Darrah, E., Lam, G. K., Bartlett, S. J., Giles, J. T., Grant, A. V., & Rosen, A. 2008. Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 58(7): 1958-1967.

Heidari, B., Abedi, H., Firouzjahi, A., & Heidari, P. 2010. Diagnostic value of synovial fluid anti-cyclic citrullinated peptide antibody for rheumatoid arthritis. Rheumatology International, 30(11): 1465-1470.

Heidari, B., Firouzjahi, A., Heidari, P., & Hajian, K. 2009. The prevalence and diagnostic performance of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: the

predictive and discriminative ability of serum antibody level in recognizing rheumatoid arthritis. Annals of Saudi Medicine, 29(6): 467-470.

Hinks, A., Marion, M. C., Cobb, J., Comeau, M. E., Sudman, M., Ainsworth, H. C., & Prahalad, S. 2018. Brief Report: The Genetic Profile of Rheumatoid Factor–Positive Polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis Resembles That of Adult Rheumatoid Arthritis. Arthritis & Rheumatology, 70(6): 957-962.

Hoppe, B., Häupl, T., Gruber, R., Kiesewetter, H., Burmester, G. R., Salama, A., & Dörner, T. 2006. Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case–control study. Arthritis Research & Therapy, 8(2): 1-6.

Hou, S., Gao, G. P., Zhang, X. J., Sun, L., Peng, W. J., Wang, H. F., & Sun, Y. H. 2013. PADI4 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Modern Rheumatology, 23(1): 50-60.

Hussein, H. M., & Rahal, E. A. 2019. The role of viral infections in the development of autoimmune diseases. Critical Reviews in Microbiology, 45(4): 394-412.

Hussein, N., Kamel, N., Fouda, N., & Farrag, D. 2019. Peptidyl-arginine deiminase-type IV as a diagnostic and prognostic marker in rheumatoid arthritis patients. The Egyptian Rheumatologist, 41(2): 87-91.

Ikari, K., Kuwahara, M., Nakamura, T., Momohara, S., Hara, M., Yamanaka, H., & Kamatani, N. 2005. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 52(10): 3054-3057.

Ishigami, A., Ohsawa, T., Hiratsuka, M., Taguchi, H., Kobayashi, S., Saito, Y., & Maruyama, N. 2005. Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. Journal of Neuroscience Research, 80(1): 120-128.

Ishikawa, Y., & Terao, C. 2020. The impact of cigarette smoking on risk of rheumatoid arthritis: a narrative review. Cells, 9(2): 475.

Iwamoto, T., Ikari, K., Nakamura, T., Kuwahara, M., Toyama, Y., Tomatsu, T., & Kamatani, N. 2006. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Rheumatology, 45(7): 804-807.

Jalil, S. F., Arshad, M., Bhatti, A., Ahmad, J., Akbar, F., Ali, S., & John, P. 2016. Rheumatoid arthritis: what have we learned about the causing factors?. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 29(2).

Jonsson, M. K., Sundlisæter, N. P., Nordal, H. H., Hammer, H. B., Aga, A. B., Olsen, I. C., & Haavardsholm, E. A. 2017. Calprotectin as a marker of inflammation in patients with early rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 76(12): 2031-2037.

Kang, C. P., Lee, H. S., Ju, H., Cho, H., Kang, C., & Bae, S. C. 2006. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 54(1): 90-96.

Kato, E., Sawada, T., Tahara, K., Hayashi, H., Tago, M., Mori, H., & Tohma, S. 2017. The age at onset of rheumatoid arthritis is increasing in Japan: a nationwide database study. International Journal of Rheumatic Diseases, 20(7): 839-845.

Kennedy, A. E., Kamdar, K. Y., Lupo, P. J., Okcu, M. F., Scheurer, M. E., & Dorak, M. T. 2015. Genetic markers in a multi-ethnic sample for childhood acute lymphoblastic leukemia risk. Leukemia & Lymphoma, 56(1): 169-174.

Khadim, N. T., & Al-Kazaz, A. K. A. 2022. Single Nucleotide Polymorphism of Padi4 Gene (Rs11203367) in A Sample of Rheumatoid Arthritis Iraqi Patients. Iraqi Journal of Science, 116-123.

Klein, S. L., & Morgan, R. 2020. The impact of sex and gender on immunotherapy outcomes. Biology of Sex Differences, 11(1): 1-10.

Kochi, Y., Thabet, M. M., Suzuki, A., Okada, Y., Daha, N. A., Toes, R. E., & Yamamoto, K. 2011. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 70(3): 512-515.

Kolfenbach, J. R., Deane, K. D., Derber, L. A., O'Donnell, C. I., Gilliland, W. R., Edison, J. D., & Holers, V. M. 2010. Autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 precedes clinical onset of rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism, 62(9): 2633-2639.

Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. Cell, 128(4): 693-705.

Krishnamurthy, A., Joshua, V., Hensvold, A. H., Jin, T., Sun, M., Vivar, N., & Catrina, A. I. 2016. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism

underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. Annals of the Rheumatic Diseases, 75(4): 721-729.

Li, X., Wang, Z., Yi, H., Xie, J., & Zhu, N. 2020. Meta-analysis: diagnostic accuracy of the citrullinated peptides derived from fibrinogen and vimentin in rheumatoid arthritis. Clinical Rheumatology, 39(4): 1111-1120.

Liao, K. P., Alfredsson, L., & Karlson, E. W. 2009. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. Current Opinion in Rheumatology, 21(3): 279.

Litao, M. K. S., & Kamat, D. 2014. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein: how best to use them in clinical practice. Pediatric Annals, 43(10): 417-420.

Littlejohn, E. A., & Monrad, S. U. 2018. Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. Primary Care: Clinics in Office Practice, 45(2): 237-255.

Mahler, M. 2017. Population-based screening for ACPAs: a step in the pathway to the prevention of rheumatoid arthritis?. Annals of the Rheumatic Diseases, 76(11): e42-e42.

Mahmood, A. S., Al-Kazaz, A. K. A., Ad'hiah, A. H., & Mayouf, K. K. 2017. Gene expression of tumor necrosis factor-alpha in etanercept-treated rheumatoid arthritis patients. Journal of Biosciences and Medicines, 5(09): 1.

Manivelavan, D., & Vijayasamundeeswari, C. K. 2012. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody: an early diagnostic and prognostic biomarker of rheumatoid arthritis. Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR, 6(8): 1393.

Marcucci, E., Bartoloni, E., Alunno, A., Leone, M. C., Cafaro, G., Luccioli, F., & Gerli, R. 2018. Extra-articular rheumatoid arthritis. Reumatismo, 70(4): 212-224.

Martinez-Prat, L., Lucia, D., Ibarra, C., Mahler, M., & Dervieux, T. 2019. Antibodies targeting protein-arginine deiminase 4 (PAD4) demonstrate diagnostic value in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 78(3): 434-436.

Martinez-Prat, L., Nissen, M. J., Lamacchia, C., Bentow, C., Cesana, L., Roux-Lombard, P., & Mahler, M. 2018. Comparison of serological biomarkers in rheumatoid arthritis and their combination to improve diagnostic performance. Frontiers in Immunology, 9: 1113.

Maślińska, M., Mańczak, M., Kwiatkowska, B., Ramsperger, V., Shen, L., & Suresh, L. 2021. IgA immunoglobulin isotype of rheumatoid factor in primary Sjögren's syndrome. Rheumatology International, 41(3): 643-649.

McInnes, I. B., & Schett, G. 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. New England Journal of Medicine, 365(23): 2205-2219.

Mo, Y. Q., Yang, Z. H., Wang, J. W., Li, Q. H., Du, X. Y., Huizinga, T. W., & Dai, L. 2019. The value of MRI examination on bilateral hands including proximal interphalangeal joints for disease assessment in patients with early rheumatoid arthritis: a cross-sectional cohort study. Arthritis Research & Therapy, 21(1): 1-12.

Mohanan, S., Cherrington, B. D., Horibata, S., McElwee, J. L., Thompson, P. R., & Coonrod, S. A. 2012. Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. Biochemistry Research International, 2012(7): 1-10.

Molenaar, E. T., Voskuyl, A. E., Familian, A., van Mierlo, G. J., Dijkmans, B. A., & Hack, C. E. 2001. Complement activation in patients with rheumatoid arthritis mediated in part by C-reactive protein. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 44(5): 997-1002.

Nicaise Roland, P., Grootenboer Mignot, S., Bruns, A., Hurtado, M., Palazzo, E., Hayem, G., & Chollet Martin, S. 2008. Antibodies to mutated citrullinated vimentin for diagnosing rheumatoid arthritis in anti-CCP-negative patients and for monitoring infliximab therapy. Arthritis Research & Therapy, 10(6): 1-7.

Nielen, M. M., Van Schaardenburg, D., Reesink, H. W., Twisk, J. W., Van De Stadt, R. J., Van Der Horst-Bruinsma, I. E., & Dijkmans, B. A. 2004. Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 50(8): 2423-2427.

Nishimura, K., Sugiyama, D., Kogata, Y., Tsuji, G., Nakazawa, T., Kawano, S., & Kumagai, S. 2007. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti–cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. Annals of Internal Medicine, 146(11): 797-808.

Nissinen, R., Paimela, L., Julkunen, H., Tienari, P. J., Leirisalo-Repo, M., Palosuo, T., & Vaarala, O. 2003. Peptidylarginine deiminase, the arginine to citrulline converting enzyme, is frequently recognized by sera of patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and primary Sjögren syndrome. Scandinavian Journal of Rheumatology, 32(6): 337-342.

Okroj, M., Heinegård, D., Holmdahl, R., & Blom, A. M. 2007. Rheumatoid arthritis and the complement system. Annals of Medicine, 39(7): 517-530.

Olivares-Martínez, E., Hernández-Ramírez, D. F., Núñez-Álvarez, C. A., Cabral, A. R., & Llorente, L. 2016. The amount of citrullinated proteins in synovial tissue is related to serum anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody levels. Clinical Rheumatology, 35(1): 55-61.

Orange, D. E., Blachere, N. E., DiCarlo, E. F., Mirza, S., Pannellini, T., Jiang, C. S., & Goodman, S. M. 2020. Rheumatoid arthritis morning stiffness is associated with synovial fibrin and neutrophils. Arthritis & Rheumatology, 72(4): 557-564.

Orellana, C., Saevarsdottir, S., Klareskog, L., Karlson, E. W., Alfredsson, L., & Bengtsson, C. 2017. Oral contraceptives, breastfeeding and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. Annals of the Rheumatic Diseases, 76(11): 1845-1852.

Osorio, Y. P., Muñoz, P. A., Bernal, B. H. A., Peñaranda, L. F. P., & Hernández, M. Á. C. 2018. Pharmacogenomics of etanercept, infliximab, adalimumab and methotrexate in rheumatoid arthritis. A structured review. Revista Colombiana de Reumatología (English Edition), 25(1): 22-37.

Otón, T., & Carmona, L. 2019. The epidemiology of established rheumatoid arthritis. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 33(5): 101477.

Panati, K., Pal, S., KV, R., & Reddy, V. D. 2012. Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of PADI4 gene with rheumatoid arthritis (RA) in Indian population. Genes & Genetic Systems, 87(3): 191-196.

Peschken, C. A., Robinson, D. B., Hitchon, C. A., Smolik, I., Hart, D., Bernstein, C. N., & El-Gabalawy, H. S. 2012. Pregnancy and the risk of rheumatoid arthritis in a highly predisposed North American Native population. The Journal of Rheumatology, 39(12): 2253-2260.

Pikwer, M., Bergström, U., Nilsson, J. Å., Jacobsson, L., & Turesson, C. 2012. Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 71(3): 378-381.

Popescu, C., Zofotă, S., Bojincă, V., & Ionescu, R. 2013. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in psoriatic arthritis–cross-sectional study and literature review. Journal of Medicine and Life, 6(4): 376.

Qiu, F., Tang, R., Zuo, X., Shi, X., Wei, Y., Zheng, X., & Ma, X. 2017. A genome-wide association study identifies six novel risk loci for primary biliary cholangitis. Nature Communications, 8(1): 1-8.

Ramos, K. C., & Macías, M. D. P. C. 2021. Microdevice immunoassay with conjugated magnetic nanoparticles for rapid anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) detection. Talanta, 224: 121801.

Ramsay, E. S., & Lerman, M. A. 2015. How to use the erythrocyte sedimentation rate in paediatrics. Archives of Disease in Childhood-Education and Practice, 100(1): 30-36.

Ren, J., Sun, L., & Zhao, J. 2017. Meta-analysis: diagnostic accuracy of antibody against peptidylarginine deiminase 4 by ELISA for rheumatoid arthritis. Clinical Rheumatology, 36(11): 2431-2438.

Rogers, G. E., Harding, H. W., & Llewellyn-Smith, I. J. 1977. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 495(1): 159-175.

Romão, V. C., Humby, F., Kelly, S., Di Cicco, M., Mahto, A., Lazarou, I., & Pitzalis, C. 2020. Treatment-resistant synovitis and radiographic progression are increased in elderly-onset rheumatoid arthritis patients: findings from a prospective observational longitudinal early arthritis cohort study. In Seminars in Arthritis and Rheumatism (Vol. 50, No. 4, pp. 735-743). WB Saunders.

Saad, M. N., Mabrouk, M. S., Eldeib, A. M., & Shaker, O. G. 2016. Identification of rheumatoid arthritis biomarkers based on single nucleotide polymorphisms and haplotype blocks: a systematic review and meta-analysis. Journal of Advanced Research, 7(1): 1-16.

Schellekens, G. A., Visser, H., De Jong, B. A., Van Den Hoogen, F. H., Hazes, J. M., Breedveld, F. C., & Van Venrooij, W. J. 2000. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 43(1): 155-163.

Shabgah, A. G., Shariati-Sarabi, Z., Tavakkol-Afshari, J., & Mohammadi, M. 2019. The role of BAFF and APRIL in rheumatoid arthritis. Journal of Cellular Physiology, 234(10): 17050-17063.

Shamsian, E., Azarian, M., Akhlaghi, M., Samaei, M., Jamshidi, A. R., Assar, S., & Mahmoudi, M. 2016. PADI4 Polymorphisms in Iranian Patients with Rheumatoid Arthritis. Acta Reumatologica Portuguesa, 41(4): 338-343.

Song, Y. W., & Kang, E. H. 2010. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. QJM: An International Journal of Medicine, 103(3): 139-146.

Spengler, J., Lugonja, B., Jimmy Ytterberg, A., Zubarev, R. A., Creese, A. J., Pearson, M. J., & 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 & Rheumatology, 67(12): 3135-3145.

Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. 2018. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. Frontiers in Immunology, 9: 754.

Sun, B., Dwivedi, N., Bechtel, T. J., Paulsen, J. L., Muth, A., Bawadekar, M., & Ho, I. C. 2017. Citrullination of NF-κB p65 promotes its nuclear localization and TLR-induced expression of IL-1β and TNFα. Science Immunology, 2(12): eaal3062.

Suzuki, A., Yamada, R., Ohtake-Yamanaka, M., Okazaki, Y., Sawada, T., & Yamamoto, K. 2005. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 333(2): 418-426.

Symmons, D. P., & Silman, A. J. 2006. Aspects of early arthritis. What determines the evolution of early undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis? An update from the Norfolk Arthritis Register. Arthritis Research & Therapy, 8(4): 1-6.

Tampoia, M., Brescia, V., Fontana, A., Maggiolini, P., Lapadula, G., and Pansini, N. 2005. Anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies measured by an automated enzyme immunoassay: analytical performance and clinical correlations. Clinica Chimica Acta, 355(1-2): 137-144.

Tanaka, T., & Kishimoto, T. 2014. The biology and medical implications of interleukin-6. Cancer Immunology Research, 2(4): 288-294.

Tang, B., Shi, H., Alfredsson, L., Klareskog, L., Padyukov, L., & Jiang, X. 2021. Obesity-Related Traits and the Development of Rheumatoid Arthritis: Evidence From Genetic Data. Arthritis & Rheumatology, 73(2): 203-211.

Targońska-Stępniak, B., Zwolak, R., Piotrowski, M., Grzechnik, K., & Majdan, M. 2020. The relationship between hematological markers of systemic inflammation (Neutrophil-To-Lymphocyte, Platelet-To-Lymphocyte, Lymphocyte-To-Monocyte Ratios) and ultrasound disease activity parameters in patients with rheumatoid arthritis. Journal of Clinical Medicine, 9(9): 2760.

Tehlirian, C. V., & Bathon, J. M. 2008. Rheumatoid arthritis: clinical and laboratory manifestations. Primer on the Rheumatic Diseases, 13: 114-21.

Terao, C., Ikari, K., Nakayamada, S., Takahashi, Y., Yamada, R., Ohmura, K., & Matsuda, F. 2016. A twin study of rheumatoid arthritis in the Japanese population. Modern Rheumatology, 26(5): 685-689.

Torkamani, A., Topol, E. J., & Schork, N. J. 2008. Pathway analysis of seven common diseases assessed by genome-wide association. Genomics, 92(5): 265-272.

Umeda, N., Matsumoto, I., Kawaguchi, H., Kurashima, Y., Kondo, Y., Tsuboi, H., & Sumida, T. 2016. Prevalence of soluble peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) and anti-PAD4 antibodies in autoimmune diseases. Clinical Rheumatology, 35(5): 1181-1188.

Valesini, G., Gerardi, M. C., Iannuccelli, C., Pacucci, V. A., Pendolino, M., & Shoenfeld, Y. 2015. Citrullination and autoimmunity. Autoimmunity Reviews, 14(6): 490-497.

Van Venrooij, W. J., Van Beers, J. J., & Pruijn, G. J. 2008. Anti-CCP antibody, a marker for the early detection of rheumatoid arthritis. Annals of the New York Academy of Sciences, 1143(1): 268-285.

Van Venrooij, W. J., Van Beers, J. J., & Pruijn, G. J. 2011. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. Nature Reviews Rheumatology, 7(7): 391-398.

Vieira Borba, V., Sharif, K., & Shoenfeld, Y. 2018. Breastfeeding and autoimmunity: programing health from the beginning. American Journal of Reproductive Immunology, 79(1): e12778.

Vossenaar, E. R., Smeets, T. J., Kraan, M. C., Raats, J. M., Van Venrooij, W. J., & Tak, P. P. 2004. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. Arthritis & Rheumatism, 50(11): 3485-3494.

Wang, F., Chen, F. F., Gao, W. B., Wang, H. Y., Zhao, N. W., Xu, M., & Li, X. J. 2016. Identification of citrullinated peptides in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis using LC-MALDI-TOF/TOF. Clinical Rheumatology, 35(9): 2185-2194.

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., & Coonrod, S. A. 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. Journal of Cell Biology, 184(2): 205-213.

Wasserman, A. 2011. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. American Family Physician, 84(11): 1245-1252.

Willis, V. C., Banda, N. K., Cordova, K. N., Chandra, P. E., Robinson, W. H., Cooper, D. C., & Holers, V. M. 2017. Protein arginine deiminase 4 inhibition is sufficient for the amelioration of collagen-induced arthritis. Clinical & Experimental Immunology, 188(2): 263-274.

Witalison, E., R Thompson, P., & J Hofseth, L. 2015. Protein arginine deiminases and associated citrullination: physiological functions and diseases associated with dysregulation. Current Drug Targets, 16(7): 700-710.

Yang, M. L., Sodré, F. M., Mamula, M. J., & Overbergh, L. 2021. Citrullination and PAD Enzyme Biology in Type 1 Diabetes–Regulators of Inflammation, Autoimmunity, and Pathology. Frontiers in Immunology, 12: 678953.

Yilmaz, S., Erbek, S., Erbek, S. S., Ozgirgin, N., & Yucel, E. 2007. Abnormal electronystagmography in rheumatoid arthritis. Auris Nasus Larynx, 34(3): 307-311.

Yuzhalin, A. E. 2019. Citrullination in CancerCitrullination in Cancer. Cancer Research, 79(7): 1274-1284.

Zamanpoor, M. 2019. The genetic pathogenesis, diagnosis and therapeutic insight of rheumatoid arthritis. Clinical Genetics, 95(5): 547-557.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Raad Maher Lafta LAFTA

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010-2014