T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Behçet Hastalığının Oral ve Sistemik Aktivitesi ile NETosis Bulguları Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Tıpta Uzmanlık Tezi

Arş. Gör. Dr. Erdem Bektaş

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet Gül

İstanbul-2023

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TTU-2021-38154

ÖNSÖZ

Romatolojinin babası olarak tanımlanan Fransız hekim Guillaume de Baillou 16. yüzyılın sonlarında ilk kez eklem rahatsızlıklarını "romatizma" ismiyle tıp terminolojisine kazandırmıştır. 1940'larda bu tür hastalıklarla ilgilenen Dr. Bernard Comroe ve Dr. Joseph Lee Hollander'in "romatoloji uzmanı (rheumatologist)" olarak isimlendirilmesiyle romatoloji bir bilim dalı olarak ortaya çıkmış ve gelişen tıp bilimiyle bağışıklık sisteminin karmaşık düzeni, hastalıklarla ilişkisi, açıklanmaya muhtaç birçok gizemi içinde barındıran otoimmun hastalıklar ve otoinflamatuar hastalıklar üzerine olan çalışmalar son zamanlarda daha da ilgi çekici hale gelmiştir.

Biz de çalışmamızı Behçet Hastalığını tıp literatürüne kazandıran meşhur Türk dermatolog Hulusi Behçet'ten ilham alarak gerçekleştirdik. Nobel ödüllü Türk bilim insanı Aziz Sancar'ın da öğütlediği gibi gündelik dedikodularla, politikalar ile uğraşmayıp; bütün enerjimizi işimize vermeye, bilim öğrenmeye gayret ettik. Bu süreçte yolumu aydınlatan, bilgi birikimi ve özverisiyle zihnimi açan, gelişmemi sağlayan, her konuda bana destek olan tez danışmanım, mentörüm ve "hocam" Prof. Dr. Ahmet Gül'e, laboratuar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Rabia Deniz, Öğr. Gör. Dr. Zeliha Emrence, Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekçi'ye, örneklerin alım sürecinde yardımcı olan Hem. Fatma Güler, Hem. Aysel Özgür, Romatoloji ve Endokrinoloji Bilim Dalları'nın tüm hemşirelerine, başta Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Meliha Nalçacı, Romatoloji Bilim Dalı'nın saygıdeğer hocaları ve eğitimime katkı sağlamış tüm hocalarıma, uzman abi ve ablalarıma, Dr. Damla Altunok, Dr. Übeyde Ayşe Gülseren, Dr. Cevat İlteriş Kıkılı, mesai arkadaşlarım Dr. Ersel Bilgin ve Dr. Ayşenur Yılmaz'a, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma ve son olarak bana çocukken masal anlatmak yerine protein sentezi anlatan, laboratuarı bir oyun alanına çeviren, bilimsel düşünceye olan merakımın bir çocukken yerleşmesine vesile olup bugünlere gelmemde emeği olan babama, bana desteğini, sevgisini esirgemeyen annem ve canım kardeşime teşekkür ederim.

Modern tıbbın kurucusu Sir William Osler'in *"Hastalık olgusunu kitaplar olmadan incelemek, keşfedilmemiş bir denize açılmaktır; hastalar olmadan kitapları incelemek ise denize hiç açılmamaktır"* sözünden hareketle bilimsel çıktılarımızın kaynak oluşturması ve klinik pratiğe dönüşmesi niyetiyle çıktığımız bu yolda, bu çalışma ile literatüre sunduğumuz katkının yeni çalışmalara ışık olması, yeni "Hulusi Behçet"ler ve "Aziz Sancar"lar yetişmesi dileğiyle…

Dr. Erdem Bektaş

İstanbul-2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **I**

İÇİNDEKİLER ..... **II**

TABLO DİZİNİ ..... **V**

ŞEKİL DİZİNİ ..... **VI**

KISALTMALAR ..... **VIII**

I. TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ÖZETLER **1**

A. Türkçe Özet 1

B. İngilizce Özet 2

II. GİRİŞ **3**

III. GENEL BİLGİLER **6**

A. Behçet Hastalığı 6

1. Tanım 6

2. Demografik Özellikler ve Epidemiyoloji 6

3. Patofizyoloji ve Genetik Yatkınlık 6

a. Behçet Hastalığının İmmunopatogenezi 6
b. Behçet Hastalığında Genetik Yatkınlık 8

4. Hastalık Bulguları 9

a. Mukokutanöz Tutulum ve Paterji Reaksiyonu 9
b. Göz Tutulumu 10
c. Kas-İskelet Sistemi Tutulumu 10
d. Kardiyovasküler Tutulum 11
e. Sinir Sistemi Tutulumu 11
f. Gastrointestinal Sistem Tutulumu 11
g. Diğer Tutulumlar 12

5. Tanı 12

6. Tedavi 12

B. Nötrofil Ekstraselüler Tuzaklar 13

1. Tanım 13

2. NETosis Mekanizması 13

3. NETosis'in *in vitro* Koşullarda Değerlendirmesi 15

C. NETosis'in Otoimmun-Otoinflamatuar Hastalıklar ile İlişkisi 15

D. Behçet Hastalığı, Nötrofiller ve NETosis 16

E. NETosis Biyobelirteçlerinin Fizyolojik Özellikleri ve Hastalıklarla İlişkisi 17

1. Hücre-dışı Serbest DNA 17

2. Nötrofil Elastaz 17

3. Myeloperoksidaz 18

4. Sitrulinlenmiş Histon-3 18

IV. AMAÇLAR 19

V. HASTALAR VE YÖNTEM 20

A. Hastalar 20

B. Serum ve Tükürük Örneklerinin Toplanması ve Saklanması 21

C. Serum ve Tükürük cf-DNA NE, MPO ve cit-H3 Düzeylerinin Ölçümü 21

D. İstatistiksel Analiz 22

VI. BULGULAR 24

A. Kontrol ve Hasta Gruplarının Demografik, Klinik ve Laboratuvar Özellikleri 24

B. Serum NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması 29

1. Kontrol ile Hasta Gruplarının Serum cf-DNA Düzeylerinin Karşılaştırılması 29

2. Kontrol ile Hasta Gruplarının Serum NE Düzeylerinin Karşılaştırılması 30

3. Kontrol ile Hasta Gruplarının Serum MPO Düzeylerinin Karşılaştırılması 31

4. Kontrol ile Hasta Gruplarının Serum cit-H3 Düzeylerinin Karşılaştırılması 32

C. Boylamsal Takipteki Serum NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması 41

D. Tükürük NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması 47

1. Kontrol ile Hasta Gruplarının Tükürük cf-DNA Düzeylerinin Karşılaştırılması 47

2. Kontrol ile Hasta Gruplarının Tükürük NE Düzeylerinin Karşılaştırılması 47

3. Kontrol ile Hasta Gruplarının Tükürük MPO Düzeylerinin Karşılaştırılması 48

4. Kontrol ile Hasta Gruplarının Tükürük cit-H3 Düzeylerinin Karşılaştırılması 49

E. Boylamsal Takip Tükürük NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması 54

F. Serum NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Korelasyon Analizleri 57

1. Serum NETosis Biyobelirteçleri ile Laboratuar Parametreleri Arasındaki Korelasyon 57

2. Serum NETosis Biyobelirteçlerinin Birbirleri Arasındaki Korelasyon 58

G. Tükürük NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Korelasyon Analizleri 61
1. Tükürük NETosis Biyobelirteçleri ile Laboratuar Parametreleri Arasındaki Korelasyon61
2. Tükürük NETosis Biyobelirteçlerinin Birbirleri Arasındaki Korelasyon 62
H. Serum ve Tükürük NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Birbirleri ile Korelasyonu 63
I. ROC analizleri 65
1. Kontrol Grubunun Hasta Grubundan Ayrımı..... 65
2. Aktif Hasta Grubunun İnaktif Hasta Grubundan Ayrımı..... 65
VII. TARTIŞMA 69
VIII. SONUÇ 79
IX. KAYNAKLAR 80
DESTEKLER 91
EKLER..... 92
Ek-1: Klinik araştırmalar etik kurulu karar formu 92
Ek-2: Bilgilendirilmiş gönüllü onam formu..... 94
ÖZGEÇMİŞ..... 96

TABLO DİZİNİ

Tablo-1. Behçet Hastalığı için ISG-1990 tanı kriterleri……12

Tablo-2. Aktif dönemde örnek alınan hastaların demografik, klinik ve laboratuar özellikleri..25

Tablo-3. İnaktif dönemde örnek alınan hastaların demografik, klinik ve laboratuar özellikleri…….……..... 26

Tablo-4. Oral aktif ve inaktif durumda (aktif olduğu andaki) iken tükürük örneği alınan hastaların oral aft özellikleri…….…….…….…….…….…….28

Tablo-5. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda serum NETosis biyobelirteçleri ile laboratuar parametreleri arasındaki korelasyon…….…….…….…….58

Tablo-6. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda serum NETosis biyobelirteçlerinin birbirleri arasındaki korelasyon…….…….…….……59

Tablo-7. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda tükürük NETosis biyobelirteçleri ile laboratuar parametreleri arasındaki korelasyon…….…….……61

Tablo-8. Kontrol grubu, Hasta grubu ve tüm örnekler grubunda tükürük NETosis biyobelirteçlerinin birbirleri arasındaki korelasyon…….…….…….……62

Tablo-9. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda serum NETosis biyobelirteçleri ile tükürük NETosis biyobelirteçleri arasındaki korelasyon ……..……...63

Tablo-10. Kontrol grubunun hasta grubundan ayrımında NETosis biyobelirteçlerinin eşik değerleri…… 65

Tablo-11. Aktif hasta grubunun inaktif hasta grubundan ayrımında NETosis biyobelirteçlerinin eşik değerleri……...……..66

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil-1. Behçet hastalığının immunopatogenezi ve genetik yatkınlık……8

Şekil-2. NETosis'in hücre-içi mekanizması…….…….…….…….…….14

Şekil-3. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında serum cf-DNA ve düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyleri…….…….…….…….…….…….35

Şekil-4. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında serum NE ve düzeltilmiş serum NE düzeyleri.…….…….…….……..…….…….36

Şekil-5. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında serum MPO ve düzeltilmiş serum MPO düzeyleri…….…….…….…….……...…….…….37

Şekil-6. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında serum cit-H3 ve düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyleri…….…….…….…….…….…….…….…..38

Şekil-7. Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif hasta gruplarında serum NETosis biyobelirteçlerinin düzeyleri…….…….…….…….…….…… 39

Şekil-8. Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif hasta gruplarında düzeltilmiş serum NETosis biyobelirteçlerinin düzeyleri…….…….…….…….…….…… 40

Şekil-9. Hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin serum düzeylerindeki değişimler.…….…….…….……43

Şekil-10. Hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin düzeltilmiş serum düzeylerindeki değişimler…….…….……44

Şekil-11. Vasküler tutulumu olan hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin serum düzeylerindeki değişimler…….…….…….……...45

Şekil-12. Vasküler tutulumu olan hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin düzeltilmiş serum düzeylerindeki değişimler…….……..46

Şekil-13. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında tükürük cf-DNA ve düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyleri…….…….…….…….…….……50

Şekil-14. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında tükürük NE ve düzeltilmiş tükürük NE düzeyleri…….…….…….…….…….……...51

Şekil-15. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında tükürük MPO ve düzeltilmiş tükürük MPO düzeyleri…….…….…….…….…….……52

Şekil-16. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında tükürük cit-H3 ve düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyleri…….…….…….…….…….……..53

Şekil-17. Hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin tükürük düzeylerindeki değişimler…….…….…….……...55

Şekil-18. Hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin düzeltilmiş tükürük düzeylerindeki değişimler…….…….…….56

Şekil-19. Hasta grubunda düzeltilmiş serum NETosis belirteçlerinin birbiriyle korelasyonu...60

Şekil-20. Hasta grubunda NETosis biyobelirteçlerinin birbiri arasındaki ilişkiyi gösteren spearman rho korelasyon katsayılarının ısı haritasında gösterilmesi…….64

Şekil-21. Aktif hasta grubunun kontrolden ayrımında NETosis biyobelirteçlerinin ROC eğrileri……...67

Şekil-22. Aktif hasta grubunun inaktif hasta grubundan ayrımında NETosis biyobelirteçlerinin ROC eğrileri……..68

KISALTMALAR

5-ASA	5-Aminosalisilik asit
AAA	Ailevi akdeniz ateşi
AAV	ANCA ilişkili vaskülit
ACPA	Anti-sitrulinlenmiş peptid antikoru
AFS	Antifosfolipid antikoru sendromu
anti-β2GPI	Anti-β2 glikoprotein I
AUC	Area under the curve (eğri altında kalan alan)
BH	Behçet Hastalığı
Ca	Kalsiyum
cf-DNA	Hücre-dışı serbest DNA
cit-H3	Sitrulinlenmiş histon-3
CRP	C-reaktif protein
ÇAA	Çeyrekler arası aralık
DADA2	Adenozin deaminaz 2 eksikliği
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
dsDNA	Çift zincirli DNA
DVT	Derin ven trombozu
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EN	Eritema nodosum
ESH	Eritrosit sedimentasyon hızı
G-CSF	Granülosit-koloni uyarıcı faktör
GA	Güven aralığı
GİS	Gastrointestinal sistem
GM-CSF	Granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör
GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HLA	İnsan lökosit antijeni
HSP	Isı şok proteini
ICAM-1	İntraselüler adezyon molekülü-1
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
ISG	Uluslararası Çalışma Grubu
kDa	Kilodalton
l	Litre
LPS	Lipopolisakkarit
mg	Miligram
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi

mi-RNA	Mikro-ribonükleik asit
ml	Mililitre
MPO	Myeloperoksidaz
MPO-ANCA	Myeloperoksidaz-anti nötrofilik sitoplazmik antikor
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBH	Nörobehçet hastalığı
NE	Nötrofil elastaz
NET	Nötrofil ekstraselüler tuzak
ng	Nanogram
NK	Doğal katil lenfosit
NOX	NADPH oksidaz
ºC	Derece Celsius
oxLDL	Okside düşük dansiteli lipoprotein
PAD2	Protein arjinin deiminaz-2
PAD4	Protein arjinin deiminaz-4
PAPA	Pyojenik artrit-pyoderma gangrenozum-akne
PKC	Protein kinaz C
PMA	Forbol-12-miristat-13-asetat
PPL	Papüllopüstüler lezyon
PR3-ANCA	Proteinaz 3-anti nötrofilik sitoplazmik antikor
RA	Romatoid artrit
RAS	Rekürren aftöz stomatit
ROC	Reciever operating characteristics (alıcı işletim karakteristiği)
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sCD40L	Çözünür CD40-ligand
SLE	Sistemik lupus eritematozus
SS	Standart sapma
sTNFR	Çözünür tümör nekrozis faktör reseptörü
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
Th	Yardımcı T lenfosit
TLR	Toll-like reseptörü (toll-benzeri reseptör)
TNF	Tümör nekrosiz faktör
TNFi	Tümör nekrozis faktör inhibitörü
TOA	Tekrarlayan oral aft
Treg	Düzenleyici T lenfosit
γδ T hücresi	Gama-delta T lenfosit
µl	Mikrolitre

I. TÜRKÇE ve İNGİLİZCE ÖZETLER

A. Türkçe Özet

Behçet Hastalığının Oral ve Sistemik Aktivitesi ile NETosis Bulguları Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Amaçlar: Behçet Hastalığı (BH) etyolojisi bilinmeyen multisistemik inflamatuar bir hastalıktır. Klinik bulguların bir kısmı nötrofilik dermatozlar içerisinde sınıflandırılmakta ve nötrofil ekstraselüler tuzakların (NET) patogenezde rolünün olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada NETosis bulgularıyla BH'nın oral ve sistemik aktivitesi arasındaki ilişki incelenmiştir.

Hastalar ve Yöntem: Çalışmaya ISG-1990 kriterlerini karşılayan (1 hasta hariç) oral ve/veya sistemik olarak aktif 30 hasta ve 10 sağlıklı birey dahil edildi. Kesitsel ve boylamsal olarak takip edilen hastaların aktif ve remisyona girdikleri dönemde serum ve tükürük örnekleri toplandı. NETosis bulgusu olarak cf-DNA, NE, MPO ve cit-H3 düzeyleri ölçüldü ve elde edilen bulgular kan nötrofil sayısına göre düzeltilerek hastaların tutulumlarına göre sınıflandırıldı ve değerlendirildi.

Bulgular: Aktif dönemde örnek alınan hastaların (n=30) %70'i erkek, ortanca yaşı 34.5 yıl ve takip süresi 54 ay iken inaktif dönemdekilerin (n=18) %61.1'i erkek, ortanca yaşı 36.5 yıl ve takip süresi 48 aydı. Oral aktifken tükürük toplanan 15 remisyona girdikten sonra da örnek alındı. BH'da serum cf-DNA ve NE düzeylerinin yüksek olduğu ($p \leq 0.001$, $p < 0.05$), düzeltilmiş serum MPO ve cit-H3 düzeylerinin ise düşük olduğu saptandı ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.01$). Serum cf-DNA'nın inaktif dönemde azaldığı saptandı ($p \leq 0.01$). Tükürük NETosis biyobelirteçlerinde kontrol ve hastalar arasında fark saptanmazken; tükürük ve düzeltilmiş tükürük cf-DNA'da boylamsal takipte azalma olduğu görüldü ($p < 0.05$). Serum cf-DNA, düzeltilmiş serum MPO ve cit-H3 ile inflamatuar belirteçler arasında ve düzeltilmiş serum NETosis belirteçlerinin birbiri arasında korelasyon saptanırken; tükürük cf-DNA, düzeltilmiş tükürük MPO ve cit-H3 ile inflamatuar belirteçler arasında korelasyon saptandı ($p < 0.05$). Serum cf-DNA ve NE ile düzeltilmiş serum MPO ve cit-H3'ün hastaları sağlıklı gruptan ayırmada; serum ve tükürük cf-DNA ile düzeltilmiş tükürük cf-DNA'nın aktif hastaların inaktif hastalardan ayrımında bir biyobelirteç adayı olarak kullanılabileceği görüldü ($p < 0.05$).

Sonuçlar: Çalışmamızda**,** BH'ında NETosis bulgularının hastalık aktivitesi ile ilişkili olabileceğini ve aktif hastalık bulguları düzeldiğinde, NETosis biyobelirteçlerinde de bir gerileme olabileceği gözlenmiştir. NETosis'in BH patogenezindeki yeri ve hastalık aktivitesini yansıtacak biyobelirteç rolünün aydınlatılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

B. İngilizce Özet

Investigation of Relationship Between the NETosis Findings and Oral and Systemic Activity of Behçet Disease

Objective: Behçet Disease (BD) is a multisystemic inflammatory disease of unknown etiology. Some of its manifestations have been classified among neutrophilic dermatosis, and neutrophil extracellular traps (NETs) have been claimed in the pathogenesis of BD. We aimed to investigate the potential relationship between the NETosis findings and oral and systemic activity of BD.

Patients and Methods: 30 orally and/or systemically active patients who met the ISG-1990 criteria (except 1 patient) and 10 healthy individuals were included into the study. Serum and saliva samples were collected from patients during their active and remission periods cross-sectionally and some of them were followed also longitudinally. cf-DNA, NE, MPO and cit-H3 levels were measured as NETosis findings and adjusted with blood neutrophil count; unadjusted and adjusted levels were evaluated according to the disease activity of the patients.

Results: The study group consisted of 30 active patients (70% men, median age 34.5 years and follow-up period 54 months) and 18 inactive patients (61.1% men, median age 36.5 years and follow-up period 48 months). Saliva samples were obtained from 15 patients with orally active disease and from 7 of them when they have no oral lesion. In BD, serum cf-DNA and NE levels were found to be high ($p \leq 0.001$, $p < 0.05$), while adjusted serum MPO and cit-H3 levels were found to be low ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.01$). There was no difference in salivary NETosis biomarkers between patients and controls, but saliva and adjusted saliva cf-DNA showed a decrease in longitudinal follow-up ($p < 0.05$). Serum cf-DNA, adjusted serum MPO and cit-H3 correlated with inflammatory markers and adjusted serum NETosis biomarkers correlated with each other; whereas saliva cf-DNA, adjusted saliva MPO and cit-H3 correlated with inflammatory markers ($p < 0.05$). Serum cf-DNA and NE, adjusted serum MPO and cit-H3 could be used as biomarker candidates to differentiate patients from the healthy group; serum and saliva cf-DNA and adjusted saliva cf-DNA could be used as biomarker candidates to differentiate active patients from inactive patients ($p < 0.05$).

Conclusions: NETosis biomarkers may show changes in association with systemic and/or local activity of BD patients in association with disease manifestations. Further studies are needed to clarify the biomarker potential of NETosis findings in BD. (This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University. Project number: TTU-2021-38154)

II. GİRİŞ

Behçet hastalığı (BH) ilk defa dermatolog Hulusi Behçet tarafından tanımlanan, kronik seyirli ve tekrarlayıcı ataklarla giden, etyolojisi bilinmeyen inflamatuar bir hastalıktır (1, 2). Deri, mukozalar, göz, eklem, damarlar, gastrointestinal sistem ve sinir sistemi gibi çeşitli doku ve organ sistemlerini etkileyebilir. Genellikle kadın ve erkekleri eşit sıklıkla etkiler fakat erkeklerde daha ağır seyretme eğilimindedir (3). Türkiye'de BH'nın prevalansı çeşitli çalışmalarda 19-421/100.000 olarak belirtilmiştir (4, 5). BH'nın patogenezinde genetik yatkınlığı olan kişilerde, özellikle HLA-B*51 doku grubunu taşıyanlarda, tetikleyici faktörlerin etkisiyle immun sistemin aktivasyonu sonucu meydana gelen endotel disfonskiyonu ve doku hasarının temel mekanizma olduğu düşünülmektedir (6-8). BH'da tekrarlayan oral aft, genital ülser, follikülit, eritema nodozum benzeri lezyonlar gibi mukokütanöz tutulum bulguları, üveit, artrit, venöz ve arteriyel tromboz, anevrizma, gastrointestinal sistemde ülserler, santral sinir sisteminde parankimal tutulum temel hastalık manifestasyonlarını oluşturur. Üveit, vasküler tutulum ve nörolojik tutulum gibi major organ tutulumları hastalık prognozunu ve kalıcı hasarı etkileyen en önemli unsurlardır (2). BH'nın tanısı için patognomonik bir bulgu ya da test yoktur ve belirli belirti ve bulguların bir arada görülmesine dayanarak, Uluslararası Çalışma Grubu-1990 (ISG-1990) tanı kriterleri gibi kriterler kullanılarak tanı konulmakta ya da hastalık sınıflandırılmaktadır (9). BH'nın tedavisinde özellikle mukokutanöz bulgular için en sık kullanılan ilaç kolşisindir, sistemik tutulumu olan hastalarda glukokortikoidlere ve immunsupresif tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır (10).

BH farklı organ ve sistemleri etkileyen özellikleriyle değişken damar vaskülitleri ve nötrofilik dermatozlar arasında sınıflandırılmaktadır. Hastalığın patogenezinde nötrofillerin rolünün olduğu uzun yıllardır düşünülse de, hangi mekanizmayla bulguların gelişmesine katkı sağladığı bilinmemektedir (7). Nötrofillerin hücre dışında bakterileri öldürebilen, granüler ve nükleer içerikten oluşan ağ benzeri iplikçikler meydana getirerek oluşturduğu yapılar nötrofil ekstraselüler tuzaklar (neutrophil extracellular traps, NET) ve NET oluşumu süreci sonunda gelişen olaylar ve çoğunlukla hücre ölümünün gerçekleşmesi de NETosis olarak tanımlanmıştır (11, 12). NETosis sürecinin doğal konak savunmasında, doku hasarı, tromboz, steril inflamasyonun düzenlenmesinde, ayrıca otoimmunite ve kanser immünitesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (13). NETosis iki yolla gerçekleşmektedir: klasik (intihar) ve vital NETosis (14). Çeşitli mekanizmalarla nötrofil granül içeriğinin sitoplazmaya salınması, histon modifikasyonu ilişkili kromatin dekondansasyonu ile başlayan süreç sonunda kromatin şişmesi, plazma membranın parçalanması ile DNA fragmanları ve hücre içeriğinin hücre dışına salınmasıyla sonlanır (14, 15). NETosis'in sistemik lupus eritamatozus (SLE), anti-nötrofilik

sitoplazmik antikor (ANCA) ilişkili vaskülit (AAV) ve romatoid artrit (RA) gibi otoimmun hastalıkların patogenezinde otoimmunitenin başlamasında ve/veya doku hasarının gelişmesinde etkili olabileceği belirtilmiştir (16). Doğal bağışıklık yanıtın aktif rol oynadığı otoinflamatuar hastalıklarda da NETosis ile ilişki gösterilmiştir (17).

BH'nın patogenezinde nötrofil aktivasyonun doku hasarında önemli rolü vardır. Nötrofil ilişkili sitokin ve kemokinlerde artış, nötrofil aracılıklı oksidatif stresin BH'da artış gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda, BH'nın vasküler tutulumunda vasküler duvarda nötrofil infiltrasyonu ile seyreden inflamasyon ve endotel hasarının etkisi gösterilmiştir (7). BH'ında da NETosis'in etkili olabileceği, hastalık patogenezinde bir katkısı olabileceği çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir (18, 19). NETosis'in BH'daki rolü üzerine yapılmış çalışmalarla birlikte mekanizmayı daha iyi açıklamak ve hastalık patogenezindeki etkisini ortaya koymak için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. NETosis ilişkili biyobelirteçlerin, NETosis'in hastalık patogenezindeki etkisinin yanında BH'nın hastalık aktivitesini göstermede kullanılabilecek bir biyobelirteç olup olmayacağı da araştırılmamıştır.

Romatolojide hastalıkların sınıflandırılması ve aktivitesinin değerlendirilmesinde biyobelirteçler önem arz etmektedir. Serolojik, proteomik ve genetik bazı biyobelirteçler birçok romatolojik hastalık için kullanılmaktadır (20). Biyobelirteçlerin özellikleri, fizyolojik ve patolojik süreçlere ya da terapötik girişimlere olan cevabın objektif şekilde ölçülüp değerlendirilmesi, hastalık tanısı ve evrelendirilmesinde araç olarak kullanılması, prognoz tayininde kullanılması ve girişimlere olan klinik yanıtın saptanması vb. olarak tanımlanmıştır (21). BH'da ise tanısal bir serolojik belirteç bulunmamaktadır, paterji testi tanısal açıdan değerlidir fakat özgünlük ve duyarlığı değişkendir, hastalık aktivitesini değerlendirmek zordur. Bununla birlikte BH'nın heterojenitesi ve yaygın olmaması nedeniyle çalışma dizaynı ve metodolojik olarak değerli çalışmalar planlamak güçtür (22).

Biz de kesitsel ve boylamsal olarak planlanan bu çalışma ile BH'nın patogenezinde NETosis etkisini göstermeyi, NETosis ilişkili biyobelirteçlerin oral ve sistemik hastalık aktivitesiyle olan değişimini gözlemeyi ve elde edilecek veriler ile tanısal ve/veya takip için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini araştıracak çalışmalara kaynak olmasını amaçladık. Bu amaçla serumda ve tükürükte NETosis biyobelirteçleri olarak hücre-dışı serbest DNA (cf-DNA), nötrofil elastaz (NE), myeloperoksidaz (MPO) ve sitrulinlenmiş-histon-3 (cit-H3) düzeylerini belirledik. cf-DNA yaklaşık 200 baz çiftinden oluşan çift zincirli DNA parçalarından meydana gelir ve tam kan, plazma, serum ve diğer vücut sıvılarında bulunur ve inme, otoimmun hastalıklar, miyokard infarktüsü gibi durumlarda cf-DNA'nın arttığı gösterilmiştir (23). NE serin proteaz ailesinden 218 aminoasit içeren tek polipeptid zincirinden

oluşan bir glikopeptitdir (24). MPO, hem peroksidaz enzim ailesine ait olan 467 aminoasitten oluşan ağır zincir ve 112 aminoasitten oluşan hafif zincirin ikişer çiftinden meydana gelir (25). NE, MPO ile birlikte hücre içi (fagolizozom) ve hücre dışı alanda bakterilerin öldürülmesinde görev alır (26). Histon 3'ün çeşitli post-translasyonel modifikasyonlarından biri olan sitrulinlenme kromatin dekondansasyonuna ve transkripsiyonel aktivasyona yol açar (27). NE ve MPO'nun bazı hastalıklarla ilişkili olduğu ve cit-H3'ün inflamatuar uyarı ile nötrofillerde arttığı gösterilmiştir (24, 28, 29). Bu bağlamda oral ve/veya sistemik olarak aktif olan BH'ları çalışmaya dahil edilmiş, hastaların aktif ve remiyon dönemlerinde alınan örneklerde belirlenen biyobelirteçler değerlendirilmiştir.

III. GENEL BİLGİLER

A. Behçet Hastalığı

1. Tanım

BH, ilk defa İstanbul Üniversitesi Dermatoloji Kürsüsünde görevli olan olan Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından tekrarlayan oral ve genital ülser ile üveit birlikteliğiyle (üçlü semptom kompleksi) seyreden yeni bir hastalık olarak tanımlanmış ve etyolojik olarak virüslerin ya da ağız içi enfeksiyonların rolünün olabileceği düşünülmüştür (1, 30). Günümüzde ise BH deri, mukozalar, göz, eklem, damarlar, gastrointestinal sistem ve sinir sistemi gibi çeşitli doku ve organ sistemlerini etkileyebilen, tekrarlayan ataklarla seyreden etyolojisi bilinmeyen inflamatuar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (3).

2. Demografik Özellikler ve Epidemiyoloji

BH kadın ve erkekleri eşit olarak etkileyen, fakat özellikle genç (<25 yaş) erkeklerde daha ağır seyretme eğiliminde olan bir hastalıktır. Genellikle 3-4. dekatlarda görülmektedir, hastalığın 40 yaşından sonra başlaması nadir görülür (3). Ortadoğu ve Uzakdoğu Asya bölgesinde sıklığının fazla olması nedeniyle coğrafik dağılım gösteren BH, ipek yolu hastalığı olarak da tanımlanmaktadır (31). Türkiye'de çeşitli çalışmalarda yetişkinlerde BH prevalansı 19-421/100.000 olarak saptanmıştır (4, 5).

3. Patofizyoloji ve Genetik Yatkınlık

BH'nın etyopatogenezi tam olarak açıklanamamakla birlikte genetik yatkınlık, çeşitli tetikleyici faktörler ve immünolojik anormallikler suçlanmaktadır (6, 7). Genetik yatkınlıkta özellikle BH ve insan lökosit antijeni (HLA)-B*51 ilişkisi ön plana çıkmaktadır (8). Genetik yatkınlığı olan bireylerde çevresel tetikleyici faktörlerin etkisi ile doğal bağışıklık yanıtın uyarılması, otoimmun T hücrelerinin aktivasyonu, proinflamatuar sitokinlerin salınması, anti-inflamatuar mekanizmalarda bozulma, endotel disfonksiyonu ve sonuçta gelişen immün aracılı doku hasarı temel patofizyolojik mekanizma olarak ileri sürülmüştür (Şekil-1) (6, 7).

a. Behçet Hastalığının İmmunopatogenezi

Çevresel tetikleyicilerin genetik yatkınlığı olan kişilerde BH patogenezinde etkili olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bazı infeksiyöz etkenler özellikle bakteriler (Streptococcus, Mycoplasma, *Helicobacter pylori)* ve virüsler (Herpes simplex virüsü 1-2, hepatit virüsleri, Parvovirüs B19) ile birlikte anormal antijen sunumuyla ortaya çıkan moleküler benzerlik tetikleyici faktörler arasında gösterilmiştir. Isı şok proteini (heat shock protein, HSP)

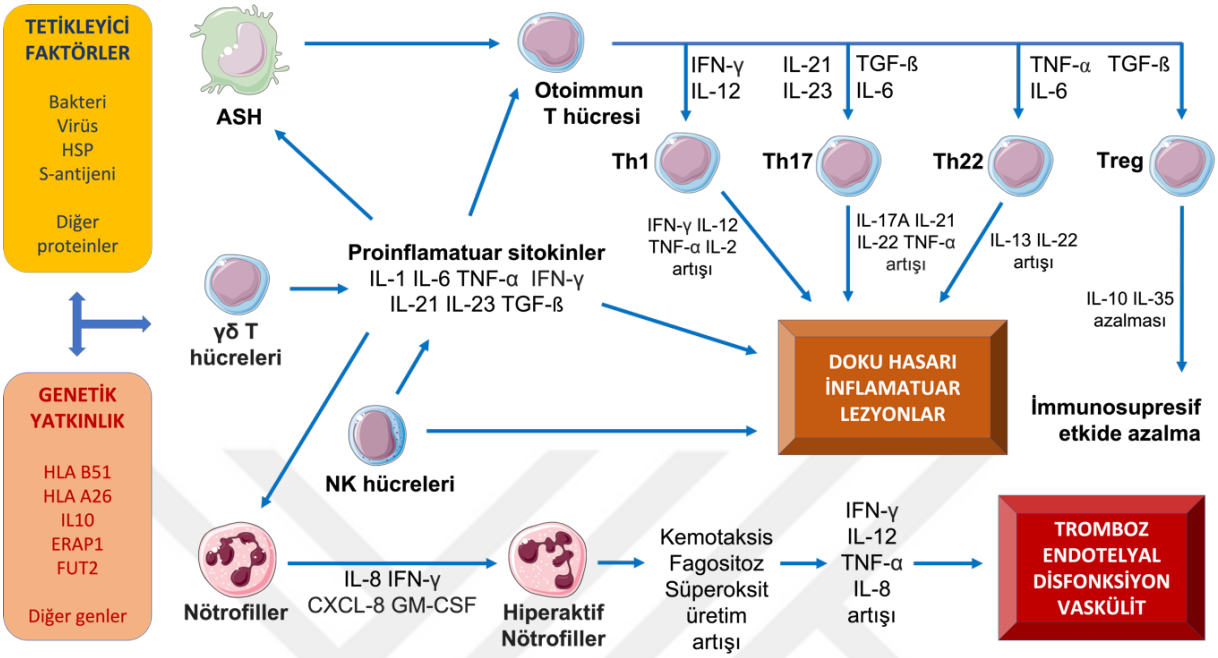
60 (HSP60), HSP70, αβ-kristallin, retina-S antijeni, α-tropomiyozin gibi otoantijenlerin BH patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (6). HSP65 ve HSP60 ekspresyonu BH lezyonlarında artmış olarak bulunmuştur (32, 33). HSP moleküllerine karşı oluşan çapraz reaksiyonun, adaptif immun yanıtı uyararak BH patogenezine katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (34).

Doğal bağışıklık sisteminde görev yapan hücrelerden doğal katil (NK) hücreler, gama-delta (γδ) T hücreleri ve nötrofiller BH patogenezinde önemli rol oynarlar (7). BH'larında sağlıklı kontrollere göre $CD56^{Dim}$ ve $CD56^{Bright}$ NK hücrelerinin periferik kanda azaldığı ve bu azalmanın hastalığın aktif döneminde daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Periferik kandaki sitotoksik etkisi olan NK hücrelerinin azalmasının, aktif inflamasyon alanına doğru yönelmelerinin bir göstergesi olabileceği belirtilmiştir (35). γδ T hücrelerinin, aktif BH'larında aktive olduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra sayısal artış göstermediği fakat fonksiyonel değişikliklerin patogenezde etkili olduğunu öne süren çalışmalar vardır (36, 37). Nötrofillerin endotel disfonksiyonu üzerine olan etkileri ve özellikle vasküler patolojilerdeki etkisi göz önüne alındığında BH patogenezinde kilit rol oynadığı birçok çalışmada belirtilmiştir (38, 39). BH'nda aktif nötrofillerin perivasküler infiltrasyon ve doku hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (38). Reaktif oksijen ürünleri (ROS) ve NET'ler ile trombo-inflamasyonun tetiklendiği ve vasküler patolojiye sebep olduğu ortaya konulmuştur (39).

Yardımcı T hücreleri (Th) 1 ilişkili sitokin üretiminin periferik kanda, mononükleer hücre sitoplazmalarında ve aktif lezyonlarda arttığı bulunmuştur (6). BH üveiti olanlarda serum ve göz aköz sıvısında interferon-gama (IFN-γ), interlökin (IL)-2, IL-12'nin arttığı; BH'da IL-18 ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α) gibi Th1 ilişkili sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (40, 41). Th1 hücre infiltrasyonu ve Th1 ilişkili kemokin reseptör ifadesinin artışı BH'nın çeşitli lezyonlarında raporlanmıştır (6). Th17 hücreleri BH'da aktif inflamasyon ile ilişkilidir ve IL-23-IL-17 aksının BH'nda inflamatuar reaksiyonda önemli patojenik rolü vardır (42). Bazı çalışmalarda dolaşımdaki Th17 sayısında, serum IL-17 ve IL-23 miktarında artış gösterilmiştir (43, 44). Th1 ve Th17 gibi Th22 ve düzenleyici T hücreleri (Treg) ile birlikte bu hücrelerle ilişkili sitokinlerin de BH patogenezinde etkin rol oynayabileceği belirtilmektedir (7). IL-21 artışı ile Th17 cevabının meydana geldiği ve Treg hücrelerin baskılanması ile BH aktivitesinin korele olduğu gösterilmiştir (45).

BH tanılı hastalarda IL-1, IL-6 ve TNF-α inflamasyon kaskadındaki temel proinflamatuar sitokinlerdir (7). Hastalığı başlatma ve devam ettirmede kritik rol üstlenen IL-1ß, IL-6 ve TNF-α'nın BH'da arttığı ortaya konulmuştur (46). Anti-inflamatuar sitokinlerden IL-37'nin mRNA ifadesi ve serum düzeyinin BH'da daha düşük olduğu bunun da IL-1, IL-6,

IL-17 ve TNF-α yüksekliği ile beraber olduğu gösterilmiştir (47). Ayrıca, yetersiz ifade olan IL-10'nun M2 monosit/makrofaj aracılı anti-inflamatuar fonksiyonlarda bozukluğa sebepler olarak BH patogenezinde etkili olabileceği belirtilmiştir (46).



Şekil-1. Behçet hastalığının immunopatogenezi ve genetik yatkınlık. (ASH: antijen sunan hücre, Th: yardımcı T hücresi, Treg: düzenleyici T hücresi, NK: doğal katil T hücresi, IL: interlökin, IFN: interferon, TNF: tümör nekrozis faktör, TGF: transforme edici büyüme faktörü, GM-CSF: granülosit-monosit koloni stimulan faktör) (*Front Immunol.* 2019;10:665, Serveir Medical Art. kullanılmıştır)

b. Behçet Hastalığında Genetik Yatkınlık

BH'nın coğrafik dağılımı ve ailesel birikim göstermesi bu hastalığa genetik yatkınlık olabileceği görüşünü güçlendirmiştir (48). Bunun üzerine yapılan genetik çalışmalarda özellikle HLA sınıf I alelleri ve bazı HLA-dışı genlerin BH'na yatkınlık oluşturma potansiyeli saptanmıştır (49). HLA sınıf I genlerinden HLA-B*51 ile BH arasında kuvvetli bir ilişki saptanmış, fakat bunun patogenetik mekanizması tam olarak açığa kavuşturulamamıştır (8). HLA-B*51 taşıyan kişilerde, ayrıca ERAP1 geninde belirli polimorfizmleri taşıyanların endoplazmik retikulum içerisinde HLA-B*51'e bağlanma afinitesi düşük bir peptidom oluşmasına neden olarak BH patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (49, 50). Majör doku uygunluk kompleksi (MHC) belirli sınıf I alelleriyle ERAP1 arasında epistatik etkileşim olduğu ve HLA-B*51, HLA-B*27 ve HLA-C*0602 alelleriyle belirli ERAP1 haplotipleri arasındaki epistatik etkileşimin sırasıyla BH, ankilozan spondilit ve psoriyazis riskini arttırdığı verisine dayanarak, MHC-I-opati kavramı altında toplanabilen bir grup Sınıf I ilişkili hastalık

için ortak bir patogenez yolunun söz konusu olabileceği düşünülmüştür (51). Tüm Genom İlişki Çalışmalarında (GWAS) HLA sınıf I genlerinin yanı sıra HLA-dışı IL10, IL23R-IL12RB2, CCR1, STAT4, KLRC4, ERAP1, GIMAP, UBAC2, FUT2 gibi genlerde BH ile ilişkili olabilecek polimorfizmler saptanmıştır (48, 49). Çeşitli mikro-ribonükleik asit (miRNA) ve deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyon farklılıklarının da epigenetik değişiklere sebep olarak BH patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (52).

4. Hastalık Bulguları

a. Mukokutanöz Tutulum ve Paterji Reaksiyonu

BH oral ülser, genital ülser ve folliküler/nodüler cilt lezyonlarına sebep olabilir (3). Oral ülser hastaların neredeyse tamamında görülür ve genellikle başlangıç bulgusudur. Sıklıkla minör ülser (çapı <1cm) görülmekle birlikte majör (≥1cm) ve herpetiform ülser de görülebilir. Ülserler en sık dil kenarı, bukkal mukoza, dudak içi ve gingivada görülürler (53). Oral mukozada tekrar eden, ağrılı ülserlerdir ve aynı anda tek ya da birden fazla sayıda olabilmektedir. Oral aftöz ülserler sıklıkla birkaç hafta içinde kendiliğinden düzelme eğilimindedir; fakat ülserler günler, aylar içinde tekrar edebilirler. Lezyonlar eritematöz, halkasal ve mukozadan hafif kabarık bir alan olarak başlayıp 48 saat içinde oval veya yuvarlak ülsere dönüşürler. Oral ülserler ağız içi lokal travmayla tetiklenebilirler (54). Oral aft şiddetiyle eşlik eden hastalık bulguları arasında belirgin ilişki olmadığı gösterilmiştir (55). Oral aftöz ülserlerin patogenezinde immun disregulasyon, inflamatuar mediyatörler, infeksiyöz ajanlar (Herpes simpleks virüsü, Streptococcus spp.), dolaşan immunkompleksler ve nötrofil göçünde artış suçlanmaktadır (56). Oral ülserlerin histopatolojik incelemesinde epidermiste spongiozis, lenfosit ve nötrofil ekzositozu gözlenmiş ve ülser yüzeyinde fibropürülan nekrotik materyal saptanmıştır. Dermiste ise interstisyel inflamasyon hakimdir, üst dermisteki inflamasyon daha belirgindir, lezyonun periferine gittikçe lenfositlerin baskın olduğu nötrofil ve histiyositlerin de eşlik ettiği inflamatuar hücresel inflitrasyonun yoğunluğu giderek azalır. Histopatolojideki en belirgin vasküler değişim dermisteki damarların çevresindeki lenfosit infiltrasyonudur, lenfositik vaskülit de görülebilmektedir (57).

Genital ülserler BH'nın en patognomonik lezyonudur ve hastaların yaklaşık %88'inde görülmektedir (58, 59). Erkeklerde en sık skrotum (%88.9), penis, femoral ve inguinal bölgede; kadınlarda ise en sık labium majus (%74.1) takiben labium minus, vestibulum ve femoral bölgede görülür. Ayrıca büyük ülserler skar bırakarak iyileşme eğilimindedir (59). Oral ve genital ülserlerin BH'da olduğu gibi birlikte görülmesi bipolar aftozis (kompleks aftozis) olarak adlandırılır ve BH dışında başka hastalıklarla ilişkili olarak da gelişebilir (55).

BH'nın cilt lezyonları papülopüstüler lezyonlar (PPL), akneiform, nodüler lezyonlar [Eritema nodozum (EN) benzeri lezyonlar ve yüzeyel tromboflebit] ve daha nadir çeşitli kutanöz vaskülitik lezyonlar olarak görülür. PPL (%28-96) ve EN benzeri lezyonlar (%15-78) en sık görülen cilt lezyonlarıdır. PPL sıklıkla gövde ve ekstremitelerde görülürken, EN-benzeri lezyonlar genellikle alt ekstremitede görülür (54). BH'daki EN-benzeri lezyonların histopatolojisinde klasik EN'a göre artmış oranda nötrofilik vaskülit bulguları dikkati çekmektedir (60).

Deri paterji reaksiyonu iğne ile oluşturulan travmadan 24-48 saat sonra gelişen papül ya da püstül ile karakterize bir hiperreaktivite yanıtıdır (61). Erkeklerde daha kuvvetli reaksiyon görülmektedir ve test pozitifliğinin sıklığı etnik farklılık göstermektedir; özellikle Japonya ve Akdeniz ülkelerinde pozitiflik sıklığı daha fazladır (54, 62). Standart deri paterji testi yerine 20G iğne ve ek olarak polisakkarit pnömonok aşısı kullanılmasıyla testin duyarlılığında artış olduğu gösterilmiştir (63). BH'da görülen paterji reaksiyonu yalnızca cilde sınırlı değildir, travmayla doku bütünlüğünün bozulduğu diğer vücut bölgelerinde de potansiyel olarak abartılı immün yanıt gelişebilir. Posttravmatik arterial trombüs, damar girişimleri sonrası anevrizma, venöz girişimler sonrası tromboflebit, eklem ponksiyonu sonrası artrit, intraoküler enjeksiyon sonrası göz inflamasyonu cilt dışı dokulardaki paterji reaksiyonuna örnek olarak gösterilebilir (2).

b. Göz Tutulumu

Üveit BH'nın temel göz tutulumudur. Daha az sıklıkla episklerit, sklerit, konjunktival ülserler, keratit, retinal vaskülit ve retinal ven oklüzyonu gibi tutulumlar görülmektedir. BH ülkemizdeki üveitlerin en sık görülen sebebidir ve üveitlerin yaklaşık %30'undan sorumludur. BH'da göz tutulumu prevalansı %40-70 olarak bildirilmiştir (64). BH üveiti non-granülomatöz karakterde, posterior ya da hem anterior hem posterior segmentleri tutarak panüveit yapabilen bir tutulum yapar; sıklıkla panüveite eşlik eden retinal vaskülitle birlikte görülür (65). BH üveiti erkeklerde daha sık görülür, daha ağır seyreder ve genellikle iki gözü de etkiler (65, 66). Ağır ve tekrarlayan inflamatuar ataklar katarakt, sekonder glokom, optik atrofi, görme bozukluğu hatta körlüğe kadar ilerleyebilecek morbiditeye sebep olabilir (64).

c. Kas-İskelet Sistemi Tutulumu

BH'da eklem tutulumu bazı serilerde %50-70'e kadar bildirilmiştir (67, 68). Deformiteye neden olmayan periferik artrit (%67) en sık görülen kas-iskelet sistemi tutulumudur, bunu takiben artralji, inflamatuar bel ağrısı ve fibromiyalji görülmektedir. Sıklık

sırasına göre artrit paternleri monoartrit (en sık diz, daha az sıklıkta bilekler), oligoaritrit ve poliartrittir (69). Nadir olarak BH'da miyozit de görülmektedir (70).

d. Kardiyovasküler Tutulum

BH tüm boydaki arter ve venleri tutabilen değişken damar vasküliti olarak tanımlanmaktadır (71). BH'da vasküler tutulum erkeklerde daha sık görülmekle birlikte prevalansı %15-50'dir ve vasküler tutulumun yaklaşık %88'i venöz tutulumdur (2). Vasküler tutulum en sık yüzeysel tromboflebit ve derin ven trombozu (DVT) (%15-40) olarak görülür (71). Venöz tutulum DVT'den sonra inferior ve superior vena cava, dural sinüs trombozu ve Budd-Chiari sendromu olarak ortaya çıkar; arteriyel tutulum ise kendini anevrizma, stenoz ve oklüzyon olarak gösterir ve en sık pulmoner arter olmak üzere, alt ekstremite arterleri, abdominal aorta, subklavian arter ve diğer arterlerin tutulumu olarak görülür (72). Tromboemboli olmadan in situ tromboz ya da anevrizma oluşumu olarak ortaya çıkabilen pulmoner arter tutulumu BH'da önemli bir mortalite nedenidir (73).

BH'da sık olmamakla birlikte koroner arter anevrizması, endokardit, miyokardit, perikardit, intrakardiyak trombüs gelişmesi, endomiyokardiyal fibrozis, miyokardiyal anevrizma ve kapak hastalıkları görülebilmektedir. İntrakardiyak trombüsler pulmoner embolinin öncü bulgusu olarak görülebildiğinden kardiyak tutulumun ciddi sonuçlarından biridir (74).

e. Sinir Sistemi Tutulumu

Nörobehçet hastalığı (NBH) olarak isimlendirilen BH'nın nörolojik tutulumları santral sinir sistemi (parankimal ve non-parankimal), periferik sinir sistemi sistemi (nöropati, miyopati) ve nadir tutulumlar olarak sınıflandırılır (75). BH'da NBH sıklığı yaklaşık %9 (%3-30)'dur (76). Parankimal tutulum beyin sapı, serebral, diffüz, spinal kord tutulumu olarak görülür (75). En sık beyin sapı tutulumu orta-beyin tutulumu görülürken, en tipik tutulum ise mesodiensefalik (beyin ve beyin sapı birlikte) tutulumdur (76). Non-parankimal tutulum dural sinüs trombozu (en sık görülen non-parankimal tutulum), intrakranial anevrizma, intrakraniyal hipertansiyon olarak ortaya çıkar (75, 76).

f. Gastrointestinal Sistem Tutulumu

BH'da gastrointestinal sistemde (GİS) tipik olarak ileoçekal tutulum görülse de gastrointestinal traktüsün tamamını tutabilir (77). BH'da GİS tutulumu coğrafi farklılık göstermektedir ve çeşitli serilerde %0-50 olarak bildirilmektedir. Sıklıkla ileoçekal bölgede derin, fokal, tek bir ülser olarak görülmekle birlikte aftöz, coğrafik ve yıldız şekilli ülserler de

görülebilmektedir (78). BH'nın intestinal tutulumunun ayrıcı tanısında inflamatuar bağırsak hastalıkları önem arz etmektedir ve Crohn hastalığına göre fistül, perforasyon, striktür ve abse gibi komplikasyonlar daha az görülmektedir (78, 79).

g. Diğer Tutulumlar

BH birçok doku ve organ sistemini etkileyebilir yaygın tutulumların yanında daha nadir görülen akciğer, ürogenital sistemde tutulum yapabilir (2, 80). Akciğerde vasküler patolojiler dışında organize pnömoni, eozinofilik pnömoni ve plevral efüzyon gibi lezyonlar görülebilir (80). BH'da erkeklerde epididimo-orşit görülebilmektedir (81). Nadir olarak AA amilodoz ve glomerolonefrit de BH'da bildirilmiştir (2).

5. Tanı

BH'nın tanı koydurucu klinik ve/veya laboratuvar bulgusu yoktur. Bu nedenle belirli klinik bulguların bir arada bulunmasına dayanan sınıflandırma/tanı kriterleri geliştirilmiştir. En sık olarak Uluslararası Çalışma Grubu-1990 (ISG-1990) tanı kriterleri kullanılmaktadır (Tablo-1). Tekrarlayan oral ülser ile birlikten göz lezyonu, cilt lezyonu ya da pozitif paterji testinden iki tanesini olması durumunda BH tanısı konulabilir; duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olmakla beraber, başlangıç döneminde olup oral aftı olmayan hastalarda kullanılamamaktadır (9).

Kriter	Tanım
Tekrarlayan oral ülser	Major, minör ya da herpetiform ülser, 12 aylık periyotta en az 3 kez tekrarlaması
Aşağıdakilerden iki tane daha	
Göz lezyonları	Anterior üveit, posterior üveit, yarık lamba muayenesinde vitreusda hücre ya da retinal vaskülit
Cilt lezyonları	Eritema nodosum benzeri lezyon, psödofolikülit, papüllopüstüler lezyon ya da akneiform lezyon (kortikosteroid almayan post-adolesan hastalarda)
Pozitif paterji testi	Steril koşullarda 20-gauge iğne ile oblik olarak uygulanan, 24-48 saat sonra değerlendirilen

Tablo-1. Behçet Hastalığı için ISG-1990 tanı kriterleri.

6. Tedavi

BH'nın tedavisinde sıklıkla mukokutanöz ve eklem tutulumunda sıklıkla kolşisin, topikal tedaviler ve glukokortikoidler kullanılırken majör organ tutulumu olan hastalarda ilaveten immunsupresif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır (10). Mukokutanöz tutulumda

hastalığın ağırlığına göre kolşisin, topikal ilaçlar, apremilast, azatioprin, talidomid, IFN-alfa (IFN-α) ve TNF inhibitörleri (TNFi) kullanılabilir (82). Üveitte glukokortikoidlerle (topikal ve/veya sistemik) birlikte azatioprin, siklosporin, TNFi, IFN-α ve alternatif ajanlar olarak IL-1, IL-6 inhibitörleri kullanılabilir (83). Eklem tutulumunda ilk basamak olarak kolşisin, sonrasında refrakter vakalarda ise azatioprin, IFN-α ve TNFi önerilmektedir. Venöz tromboz ve santral sinir sistemi tutulumunda azatioprin, IFN-α ve TNFi kullanılabilir. GIS tutulumda 5-ASA, azatioprin ve TNFi kullanılabilir (82). Periferik arteriyal tutulum ve pulmoner arter tutulumunda siklofosfomid sonrası azatioprin, TNFi ve seçilmiş hastalarda cerrahi tedavi uygulanabilir (10). BH'nın akut alevlenmelerinde sıklıkla glukokortikoidler kullanılmaktadır (82).

B. Nötrofil Ekstraselüler Tuzaklar

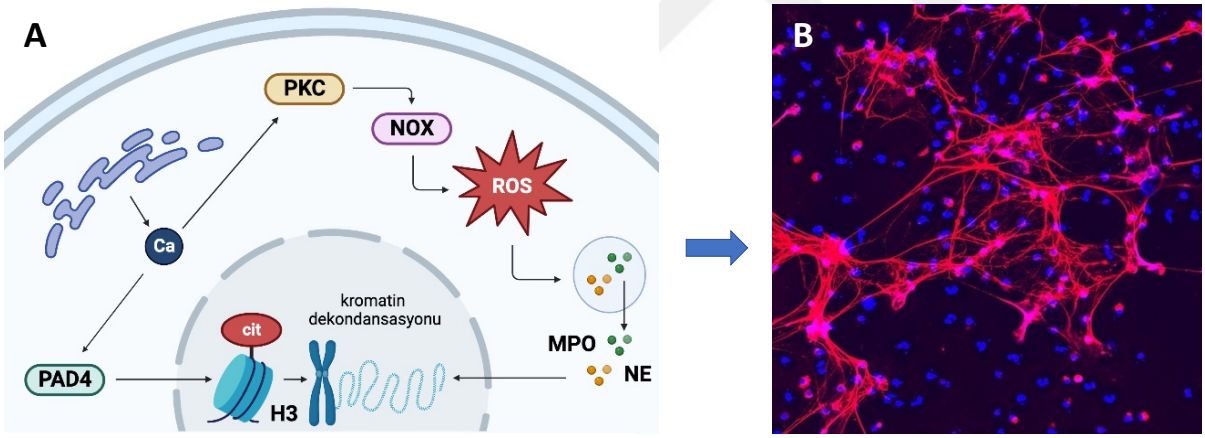
1. Tanım

Doğal bağışık sisteminin temel elemanı olan nötrofiller, mikroorganizmalara karşı birçok mekanizma ile vücut savunmasında görev alırlar (84). NET ilk defa 2004 yılında Brinkmann ve ark. tarafından nötrofillerin hücre dışında granüler ve nükleer içerikten oluşan ağ benzeri iplikçikler oluşturarak bakterileri öldüren doğal bağışıklık yanıtı oluşturmaları şeklinde tanımlanmıştır (11). Birtakım faktörlerin etkisiyle nötrofil nükleus zarının parçalanması, nötrofil içerisindeki granüllerin degranülasyonu ve DNA fragmanlarının hücre dışına çıkma süreci sonrası hücre ölümünün gerçekleşmesi olayı NETosis olarak isimlendirilmiştir (12, 85). NETosis konak savunması, doku hasarı, tromboz, steril inflamasyonun düzenlenmesi, otoimmunite ve kanser gibi birçok fizyolojik ve patolojik durumda önemli rol oynamaktadır (13).

2. NETosis Mekanizması

NETosis temel olarak klasik (intihar) NETosis ve vital NETosis olarak iki şekilde meydana gelir. Klasik NETosis özel bir programlı hücre ölümüdür ve granül içeriğinin sitoplazmaya salınması, histon modifikasyonu ilişkili kromatin dekondansasyonu ile karakterizedir (14). Çeşitli tetikleyicilerle [bakteriler, virüsler, forbol-12-miristat-13-asetat (PMA), hidrojen peroksit (H_2O_2), aktive trombosit, IL-8, anti-β2 Glikoprotein-I (GPI), okside düşük dansiteli lipoprotein (oxLDL) vb.] meydana gelen nötrofil aktivasyonu sonucu hücre içi kalsiyum konsantrasyonun artışı ile birlikte protein arjinin deiminaz-4 (PAD4) enziminin ve kinazların aktivasyonu yanında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aracılı oluşan ROS'lar NETosis'in başlamasında rol oynarlar (86). PAD4 enzimi histon

sitrulinasyonunda görev alarak NETosis sırasında kromatin dekondansasyonuna aracılık eder (87). Granül içeriğinde bulunan proteazların sitoplazmaya salınması sonucu ortaya çıkan MPO ve NE kromatin dekondansasyonuna katkıda bulunur (88). Sonra DNA fragmanları ilk olarak sitoplazmaya, daha sonra da hücre dışına salınır. DNA'nın sitoplazmaya salınması nükleusda veziküleşme, membranda yırtılma ve geçirgenliğinde artma gibi nükleus membranındaki değişimler ile gerçekleşir. NETosis sırasında hücre iskeleti elemanları olan aktin, mikrotübül ve intermediyer filamanlarda depolimerizasyon meydana gelir (86, 89). Kromatin şişmesi sonucu plazma membranın parçalanması ile DNA fragmanları ve hücre içeriği hücre dışına salınır (15) (Şekil-2). Vital NETosis ise hücre dışına DNA salınması gerçekleşmesine rağmen nötrofilin yaşamsal ve fonksiyonel özelliklerinin devam ettiği bir durumdur (14). Bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS), nötrofil aktivasyonuna sebep olan trombositlerdeki Toll-like reseptör (TLR) 4 yoluyla hücre lizisine yol açmadan hızlı NET salınımına neden olduğu gösterilmiştir (90). Bazı reseptörlerin uyarılmasıyla hücre ölümü ile sonuçlanmadan mitokondriyal DNA'nın hücre dışına salınarak NET oluşumuyla seyreden vital NETosis oluşabileceği gösterilmiştir (91).



Şekil-2. NETosis'in hücre-içi mekanizması ve klasik NETosis'e uğrayan nötrofiller. A. NETosis'in indüklenmesi sonrası hücre içinde endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya kalsiyum çıkışıyla başlayıp, klasik NETosis ile sonuçlanan hücre içi kaskad (BioRender kullanılmıştır). **B.** Levamizol ile indüklenerek NETosis'e uğramış nötrofiller, nötrofil elastaz (kırmızı) ile kompleks oluşturmuş DNA (mavi) (Carmelo Carmona-Rivera, PhD ve NIAMS Sistemik Otoimmunite Dalı Mariana J. Kaplan, MD, Şef tarafından çekilmiştir, https://www.flickr.com/photos/niams_nih/36318350842/, lisans izni: CC BY-NC-SA 2.0). (Ca: kalsiyum, PKC: protein kinaz C, NOX: NADPH oksidaz, ROS: reaktif oksijen ürünleri, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit: sitrullin, H3: histon-3, PAD4: protein arjinin deiminaz 4)

3. NETosis'in *in vitro* Koşullarda Değerlendirmesi

NETosis varlığı *in vitro* koşullarda direkt veya indirekt metotlarla gösterilebilmektedir. Direkt gösterme yöntemleri mikroskobik inceleme, akan hücre ölçer, gerçek zamanlı görüntüleme teknikleri ve *in vivo-in situ* yöntemler olarak özetlenebilir (92). Mikroskobik incelemede hücrede NETosis ilişkili proteinlerinin ekspresyonunu gözlemlemek için ilgili proteinlerin antikorları kullanılarak immunfloresan yöntemle inceleme yapılabilir (93). Konfokal mikroskop veya elektron mikroskobu kullanılarak yapılan çalışmalar da literatürde mevcuttur. Spesifik NETosis görüntüleme yöntemlerinin gözlemci bağımlı olması bu yöntemlerin dezavantajıdır (92). Akan hücre ölçer ile ölçüm metodu gözlemciden bağımsız ve direkt kandan NET miktarının ölçülebildiği bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (94). Eş zamanlı olarak hem intihar NETosis hem de vital NETosis'de *in vitro* tetiklenmiş ya da *ex-vivo* gözlenen NET oluşumlarının ölçülmesini sağlayan yöntemler de mevcuttur (95). NETosis sürecinde açığa çıkan DNA, histonlar, PAD4, MPO, kalprotektin, laktoferrin ve NE gibi nötrofil içi elemanlar "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA) yöntemi ile indirekt NETosis biyobelirteçleri olarak ölçülebilir (92). Ayrıca, NET kalıntılarından cf-DNA miktarı PicoGreen boyası ile florometrik yöntemlerle saptanabilir (96).

C. NETosis'in Otoimmun-Otoinflamatuar Hastalıklar ile İlişkisi

Sistemik otoimmun hastalıklar çeşitli otoantijenlere karşı tolerans kaybı ile karakterize hastalıklardır. NETosis yoluyla nötrofil içerisinden [MPO, çift zincirli DNA (dsDNA), histonlar vb.] dışarı salınan moleküller sistemik otoimmuniteye sebep olan otoantijenler olarak tanımlanabilmektedir. Bu da fazla NET oluşumunun, yatkınlığı olan bireylerde otoimmun cevabın başlamasında önemli rol üstlenebileceğini düşündürmektedir (16).

SLE'da NET oluşturma yeteneği yüksek olan düşük dansiteli granülosit miktarında artış ve meydana gelen NET içeriğinde birçok otoantijen ve immun-uyarıcı moleküllerin olduğu belirtilmektedir (16, 17). NET'lerin tip 1 IFN üretiminin aktive edilmesi ve NET degredasyonunun bozulmasıyla lupus patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (97, 98). AAV'de de hasarlı dokuda NET oluşumu ve NET ilişkili belirteçlerin arttığı gösterilmiştir (99, 100). AAV'de doku hasarı üzerine olan etkilerinin yanında hastalık ilişkili otoantikorların (MPO-ANCA ve PR3-ANCA) oluşumu ile NET arasında ilişki gösterilmiştir (101). RA'da NETosis'in arttığı ve anti-sitrulinlenmiş peptid antikorunun (ACPA) gelişmesinde NET içeriğindeki sitrulinlenmiş otoantijenlerin katkısının olabileceği ve sinoviyal fibroblastların inflamasyon yanıtını uyarabildiği gösterilmiştir (102). SLE, AAV ve RA gibi otoimmun

hastalıkların yanında antifosfolipid antikoru sendromu (AFS) ve inflamatuar myopatiler de NETosis etkisi olabileceği belirtilmiştir (17).

Otoinflamatuar hastalıklarda, otoimmun hastalıklar gibi otoantijenlere karşı tolerans kaybı, belirgin T ve B hücrelerinin aktivasyonu yerine özellikle nötrofillerin dahil olduğu doğal bağışıklık yanıtta artış söz konusudur (103). NETosis'in adenozin deaminaz 2 eksikliği (DADA2), VEXAS sendromu, piyojenik artrit-piyoderma gangrenozum-akne (PAPA) sendromu, ailevi Akdeniz ateşi (AAA), erişkin başlangıçlı Still hastalığı ve gut gibi otoinflamatuar hastalıkların patogenezinde etkili olabileceği düşünülmektedir (17, 104). Örneğin, gutta monosodyum ürat kristallerinin NET oluşumuna ve agregasyonuna neden olmakla birlikte NETosis agregatlarının inflamasyonun çözülmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (105). Ayrıca otoinflamasyonda önemli yeri olan NLRP3 inflamazom ve Gasdermin D'nin NETosis ile ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (106, 107).

D. Behçet Hastalığı, Nötrofiller ve NETosis

Doğal bağışıklığın önemli elemanı olan nötrofiller, BH patogenezinde temel rol oynamaktadır (3, 39). BH'da nötrofillerin kemotaktik aktivitesinin arttığı ve nötrofil kemotaksisini inhibe eden kolşisinin tedavide kullanabileceği ilk kez Matsumura ve ark. tarafından gösterilmiştir (108). Nötrofil yüzeyindeki CD11a, CD10, CD14 gibi aktivite belirteçlerinde artış gösterilmiştir (109). Nötrofillerin fagositik aktivitesi, süperoksit üretimi ve MPO seviyesinin arttığı belirtilmiştir (6). Hiperaktif nötrofiller hem dolaşımda artmıştır hem de etkilenen çeşitli doku ve organlarda infiltrasyon meydana getirmektedir. Özellikle papüllopüstüler ve nodüler cilt lezyonları, sinoviyum, intestinal ülser ve paterji reaksiyonu alanında lenfositlerle birlikte nötrofil infiltrasyonu görülmektedir (3). Oral ülserin histopatolojik incelemesinde de nötrofil infiltrasyonu görülmektedir (57). BH'larının tükürüklerinde NE, HNP 1-3, LL-37, S100 gibi nötrofil ürünlerinde artışla birlikte HNP 1-3'ün oral ülser aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (110-112). BH aynı zamanda sistemik bir vaskülit olarak da tanımlanmaktadır. BH'ında trombozların, nötrofillerin etkin rol oynadığı tromboinflamasyon sonucu oluşan endotel hasarıyla geliştiği düşünülmektedir. Nötrofillerin ROS üretimi ile fibrinojen fonksiyonlarında değişime sebep olması, perivasküler infiltrasyon sonucu oluşturduğu doku hasarı ve NETosis etkisi sonucu artan eğilimle BH'da tromboz meydana gelmektedir (3, 71, 113).

BH'da NETosis ürünlerinin arttığı, *in vitro* ortamda ve hasarlı dokularda NETosis varlığı ve hastalığın patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (114). Vasküler tutulumu olmayan BH'ında yapılan çalışmada sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında NET ürünlerinin

ve ROS'ların arttığı ile birlikte aktif hastalarda NET ürünleri ile ROS arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir; ayrıca *in vitro* kolşisin uygulaması sonrası NETosis de azalma olduğu gösterilmiştir (18). Başka bir çalışmada ise düşük dansiteli nötrofil ve NET üretiminde artış sapmasına rağmen fagositoz kapasitesinde ve ROS üretiminde sağlıklı kontrollere göre azalma saptanmıştır (115). BH'da PAD4 mRNA ekspresyonunun arttığı ve NETosis'in endotel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi sayesinde vaskülit patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (116). Ayrıca, BH'nın serumunda NETosis belirteçleri olan MPO-DNA kompleksi ve cf-DNA miktarının artışının yanında vasküler lezyonlarda histopatolojik olarak NETosis varlığı gösterilmiştir (19).

E. NETosis Biyobelirteçlerinin Fizyolojik Özellikleri ve Hastalıklarla İlişkisi

1. Hücre-dışı Serbest DNA

cf-DNA, sağlıklı bireylerin kanında serbest nükleik asitlerin saptanmasıyla ilk kez Mandel ve Me´tais tarafından gösterilmiştir (117). cf-DNA yaklaşık 200 baz çiftinden oluşan düşük moleküler ağırlıklı ve düşük konsantrasyonlu çift zincirli DNA parçalarından meydana gelir ve tam kan, plazma, serum ve diğer vücut sıvılarında bulunarak proteinler ya da membrana bağlı yapılarla kompleks oluşturabilir (23). Nekrozis, apoptozis, piroptozis, aktif DNA salınması ve NETosis gibi hücresel olaylar cf-DNA'nın kaynağını oluşturur. Ölü hücrelerden fagositoz-aracılı DNA salınımı, hücre yaşlanması, sepsis, oksidatif stres, steril inflamasyon ve kanser cf-DNA ortaya çıkmasına sebep olur. cf-DNA'nın ortamdan temizlenmesi deoksiribonükleaz (DNAaz) enzimiyle olur ve DNAaz fonksiyon bozukluklarının bazı hastalıkların patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (118). İnme, otoimmun hastalıklar, miyokard infarktüsü gibi durumlarda cf-DNA'nın arttığı ve/veya hastalık patogenezine katkı sağlayabileceği belirtilmiştir (23).

2. Nötrofil Elastaz

NE serin proteaz ailesinden, 218 aminoasit içeren ve tek polipeptid zincirinden oluşan bir glikopeptitdir (24, 119). Nötrofillerin primer (azurofilik) granüllerinde depolanır (24). İnsanda 19. kromozomun p13.3 segmentindeki *ELA2* geni tarafından kodlanır (120). NE, MPO ile birlikte hücre içi (fagolizozom) ve hücre dışı alanda bakterilerin öldürülmesinde görev alır (26). Ekstraselüler matriks proteinlerinin degradasyonu, inflamatuar mediatörlerin parçalanması, lenfosit ve trombosit aktivasyonu, sitokin ve kemokinlerin indüklenmesi gibi biyolojik fonksiyonları da vardır. Ayrıca, bazı akciğer hastalıkları, glomerulonefrit, artrit gibi çeşitli infeksiyöz ve inflamatuar hastalıklarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (24).

3. Myeloperoksidaz

MPO Hem peroksidaz enzim ailesine ait olan, 467 aminoasitten oluşan ağır zincir ve 112 aminoasitten oluşan hafif zincirin ikişer çiftinden meydana gelen moleküler ağırlığı 150 kDa olan bir proteindir (25, 121). Kodlayan *MPO* geni 17. kromozomun q23.1 segmentinde bulunur (122). Nötrofillerin primer granüllerinde depolanan MPO, H_2O_2'i NADPH oksidaz ile moleküler oksijen ürünlerine dönüştürerek "respiratuar patlama kompleksi" oluşumunu sağlar (123). MPO, H_2O_2 varlığında hipoklorik asit, kloraminler, hidroksil radikalleri, oksijen ve ozon gibi oksidan ürünlerin üretilmesiyle bakterilerin öldürülmesini sağlar (25, 121). Fizyolojik etkilerinin yanında çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklar, bazı böbrek hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, akciğer hastalıkları, kronik inflamatuar hastalıklar ve karsinogenezde etkisi olduğu belirtilmiştir (29).

4. Sitrulinlenmiş Histon-3

Ökaryotik hücrelerin DNA'sını saran histonlar, nükleozom yapısını meydana getirerek transkripsiyon, replikasyon ve DNA onarımı gibi aktif süreçlerde rol oynarlar (124). Nükleozom 147 baz çiftlik DNA'nın etrafını 1.65 tur saran bir histon oktamerinden (her birinden ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4) oluşur (125). Metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon vb. histon modifikasyonları ile kromatin kondansasyonu, gen ekspresyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi hücresel faaliyetlerde rol oynarlar (124). H3 histon varyantlarının asetilasyon, ADP-ribozilasyon, biotinilasyon, sitrulinasyon, glutatyonilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonları gösterilmiştir (27). Arginin rezidülerinin PAD enzim ile deiminasyonu sonucu sitruline dönüşmesi süreci sitrulinasyon olarak tanımlanır (126). H3 sitrulinasyonu PAD2 ve PAD4 enzimi ile meydana gelerek, lokal kromatin dekondansasyonuna ve transkripsiyonal aktivasyona yola açar (27). İnflamatuar uyarı ile nötrofillerde histon deiminisyonu sonucu cit-H3 ortaya çıktığı ve cit-H3'ün NETosis'in bir komponenti olarak açığa çıktığı gösterilmiştir (28).

IV. AMAÇLAR

Bir grup hastanın ve kontrolün kesitsel ve boylamsal izlenmesiyle yürütülen bu tez çalışmasında NETosis biyobelirteçleri olan cf-DNA, NE, MPO ve cit-H3'ün serum ve tükürük düzeylerinin hastaların aktif dönemlerinde ve bulguların gerileyerek remisyona girdikleri inaktif dönemlerinde toplanan örneklerde ölçülerek NETosis ile BH'nın oral ve sistemik hastalık aktivitesi arasındaki ilişkisinin ortaya konması, BH'nın patogenezinde NETosis etkisinin incelenmesi ve hastalığın tanı ve/veya takibinde kullanılabilecek muhtemel biyobelirteçlerin taranması amaçlanmıştır.

V. HASTALAR VE YÖNTEM

A. Hastalar

Kesitsel ve boylamsal deneysel araştırma olarak planlanan bu tek merkezli çalışma, Eylül 2021 ile Kasım 2022 tarihleri arasında İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi'nde gerçekleştirildi. Romatoloji Bilim Dalında takip edilen veya Genel Dahiliye Bilim Dalı polikliniğine başvurup Romatoloji Bilim Dalı polikliniği tarafından takibe alınan ISG-1990 tanı kriterlerini (9) karşılayan 18 yaşından büyük oral ve/veya sistemik aktif hastalık bulgusu olan toplam 30 BH'sı ve 10 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi (tekrarlayan oral aft, paterji pozitifliği ve tipik vasküler tutulum ile BH tanısı alan 1 hasta kriter dışı olmasına rağmen çalışmaya dahil edildi). Aktif hastalık, örnek alınması sırasında BH ile ilişkili bulguların varlığına, inaktif hastalık ise en az 1 aydır herhangi bir hastalık bulgusunun olmamasına ve akut faz yanıtının normal sınırlarda olmasına göre belirlendi. Poliklinik viziti ve örnek alınması sırasında oral aftöz ülseri olan hastalar ''oral aktif hastalık''; hastalıkla ilişkili artrit, üveit, vasküler tutulum, nörolojik tutulum ve gastrointestinal tutulum vb. sistemik manifestasyonu olan veya inflamatuar belirteçleri yüksek olan mukokutanöz tutulumlu (genital ülser, eritema nodosum vb.) hastalar ''sistemik aktif hastalık'' olarak tanımlandı. Oral veya sistemik aktif hastalık durumunda değerlendirildikten ve örnek alındıktan sonra, tedavilerde yapılan değişikliklerle veya aynı tedavi altında aktif hastalık bulguları gerileyen, klinik bulgusu olmayan ve inflamatuar parametreleri normal sınırlarda olan hastalar ''inaktif hastalık'' olarak tanımlandı. BH ile birlikte nötrofil fonksiyonlarını etkileyebilecek ek hastalığı (aktif enfeksiyon vb.) olan ve TNFi gibi biyolojik tedavi kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Tüm hastaların demografik özellikleri, kümülatif klinik verileri, aktif oral (oral aftöz ülser sayısı, tipi, süresi ve tekrarlama sıklığı) ve sistemik hastalık tutulum özellikleri, aktif dönemde ve inaktif dönemde iken örneklerin toplandığı güne ait tam kan sayımı, C-reaktif protein (CRP) ve eritrosit sedimantasyon hızı (ESH) değerleri, daha önce kullandığı immunsupresif ilaçlar ve güncel tedavisi konusundaki bilgiler hasta takip dosyalarından edinilerek standart bir forma kaydedildi.

Bu çalışma protokolü İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Kapsam Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih-Sayı: 2021-231298) (Ek-1) ve Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi'nde belirtilen standartlara uygun şekilde yürütüldü (127). Tüm hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden çalışmaya başlamadan önce bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alındı (Ek-2).

B. Serum ve Tükürük Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Hastalardan aktif-inaktif hastalık dönemlerinde ve sağlıklı kontrol grubundan venöz kan örnekleri vakumlu kuru tüplere alındı, 3000 rpm'de 10 dakika (dk) santrifüjlenerek elde edilen serum örnekleri kriyotüplere alikote edip bölüştürülerek analiz edilene kadar -80ºC'de uygun koşullarda saklandı.

Hastalardan aktif-inaktif hastalık dönemlerinde ve sağlıklı kontrol grubundan 3-5 ml uyarılmamış tam tükürük (unstimulated whole saliva) örnekleri 5-10 dk içerisinde 15 ml falcon tüplere alındı. Tüm tükürük örnekleri saat 08.00-12.00 arasında, toplama günü ve öncesinde sigara içilmeden, en az 1.5 saat öncesinde yeme-içme kesilerek, oral hijyene dikkat edilerek ve tükürük örneği vermeden önce ağız içi su ile hafifçe çalkalandıktan sonra toplandı. Falcon tüplere toplanan tükrük örnekleri 3500 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlar kriyotüplere alikote edip bölüştürülerek analiz edilene kadar -80ºC'de uygun koşullarda saklandı.

C. Serum ve Tükürük cf-DNA NE, MPO ve cit-H3 Düzeylerinin Ölçümü

Serum ve tükürük cf-DNA seviyelerinin ölçümü için Invitrogen Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, ABD) kiti yönergesine uygun olarak kullanıldı. Ölçümde kullanılacak tüm reaktifler ve örnekler hazırlandı. Yüksek aralık standart eğrisine göre standartlar hazırlandı. Hazırlanan her örneğe 100 µl Quant-iT PicoGreen dsDNA reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 2-5 dk ışıktan korunarak inkübasyon sağlandı. İnkubasyon sonrası Invitrogen Qubit 2.0 florometre cihazı (ThermoFisher Scientific, Waltham, ABD) ile standart dalga boyunda (480 nm eksitasyon, 520 nm emisyon) absorbansı ölçüldü. cf-DNA düzeyi ng/ml olarak hesaplandı. Gönüllülere eş zamanlı olarak yapılmış olan hemogram ölçümlerindeki mutlak nötrofil sayıları kullanılarak, 1 milyon nötrofil başına düşen cf-DNA miktarı hesaplandı ve düzeltilmiş cf-DNA olarak adlandırıldı.

Serum ve tükürük NE seviyelerinin ölçümü için 96 kuyu içeren ELISA kiti (Elabscience, E-EL-H1946, Teksas, ABD) yönergesine uygun şekilde kullanıldı. Ölçümde kullanılacak tüm reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlandıktan sonra 100 µl standart ya da örnek kuyulara yüklendi ve 37ºC'de 90 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyulardaki sıvı döküldü, hızlıca 100 µl biyotinlenmiş saptama antikorlu solüsyon her bir kuyuya eklendi ve 37ºC'de 60 dk inkübasyon sağlandı. İkinci inkübasyon tamamlandıktan sonra plak 3 kez aspire edildi ve yıkandı. Daha sonra kuyulara streptavidin-HRP solüsyonu eklendi, 37ºC'de 30 dk inkübasyon sağlandıkdan sonra 5 kez aspire edildi ve yıkandı. Kuyulara 90 µl kromojen çözelti eklendi ve 37ºC'de 15 dk inkübasyon sağlandıktan sonra 50 µl sonlandırıcı solüsyonu eklendi,

hazırlanan plağın absorbansı mikroplak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü. NE düzeyi ng/ml olarak hesaplandı. Gönüllülere eş zamanlı olarak yapılmış olan hemogram ölçümlerindeki mutlak nötrofil sayıları kullanılarak, 1 milyon nötrofil başına düşen NE miktarı hesaplandı ve düzeltilmiş NE olarak adlandırıldı.

Serum ve tükürük MPO seviyelerinin ölçümü için 96 kuyu içeren ELISA kiti (Hycult Biotech, HK324, Uden, Hollanda) yönergesine uygun şekilde kullanıldı. Ölçümde kullanılacak tüm reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlandı. 100 µl standart ya da örnek kuyulara yüklendi ve oda sıcaklığında 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 200 µl yıkama solüsyonu kuyulara konulduktan sonra 20 şer saniye beklenilerek plak 4 kez yıkandı. Yıkama sonrası her bir kuyuya 100 µl takip solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 60 dk inkübasyon sağlandı. İkinci inkübasyondan sonra daha önce bahsedildiği şekilde yıkama uygulandı. Daha sonra her bir kuyuya TMB substratı eklendi ve direkt gün ışığından korunacak şekilde oda sıcaklığında 30 dk inkübasyon sağlandı. İnkübasyondan sonra 100 µl sonlandırıcı solüsyonu eklendi, hazırlanan plağın absorbansı mikroplak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü. MPO düzeyi ng/ml olarak hesaplandı. Gönüllülere eş zamanlı olarak yapılmış olan hemogram ölçümlerindeki mutlak nötrofil sayıları kullanılarak, 1 milyon nötrofil başına düşen MPO miktarı hesaplandı ve düzeltilmiş MPO olarak adlandırıldı.

Serum ve tükürük cit-H3 seviyelerinin ölçümü için 96 kuyu içeren ELISA kiti (MyBiosource, MBS3804611, San Diego, ABD) yönergesine uygun şekilde kullanıldı. Ölçümde kullanılacak tüm reaktifler, örnekler ve standartlar hazırlandı. 50 µl standart ve 40 µl diluye edici ile 10 µl örnek kuyulara yüklendi. 100 µl HRP konjugatı her bir kuyuya eklendi ve 37°C'de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plak 400 µl yıkama solüsyonu ile 5 kez aspire edildi ve yıkandı. Daha sonra 50 µl kromojen solüsyon A ve 50 µl kromojen solüsyon B her bir kuyuya eklendi, ışıktan korunarak 37°C'de 15 dk inkübasyon sağlandı. İkinci inkübasyon sonrası 50 µl sonlandırıcı solüsyonu her bir kuyuya eklendi, hazırlanan plağın absorbansı mikroplak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü. cit-H3 düzeyi ng/ml olarak hesaplandı. Gönüllülere eş zamanlı olarak yapılmış olan hemogram ölçümlerindeki mutlak nötrofil sayıları kullanılarak, 1 milyon nötrofil başına düşen cit-H3 miktarı hesaplandı ve düzeltilmiş cit-H3 olarak adlandırıldı.

D. İstatistiksel Analiz

Değişkenlerin dağılımları histogram, çarpıklık-basıklık katsayıları, Q-Q grafiği ve Shapiro-Wilk veya Kolmogorov-Smirnov testlerinden uygun olanı kullanılarak belirlendi. Değişkenlerin normal dağılıma uyanları ortalama ± standart sapma (SS) olarak belirtilirken;

normal dağılıma uymayan değişkenler ortanca [çeyrekler arası aralık (ÇAA)] olarak belirtildi. Sürekli bağımsız ve bağımlı değişkenlerin gruplar arasındaki farkları, verilerin dağılım özelliği ve örneklem sayısı göz önüne alındığında non-parametrik testlerden Wilcoxon ya da Mann-Whitney *U* testi kullanılarak değerlendirildi. Kategorik değişkenler ki-kare ve Fisher exact testi ile karşılaştırıldı. Biyobelirteç düzeyleri ile laboratuar parametreleri ve biyobelirteçlerin kendi arasındaki korelasyon analizleri, ilgili değişken en az bir grupta normal dağılım göstermediği için Spearman korelasyon testi kullanarak gerçekleştirildi. Biyobelirteçlerin BH olmayı ve BH'nın aktivitesini ön görmede tanısal karar verdirici özellikleri alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrileri ile hesaplanan eğri altında kalan alan (AUC) kullanılarak belirlendi. Tüm istatistiksel analizler iki yönlü olarak ve SPSS (SPSS v26.0, IBM Corp., Armonk, New York, ABD) programı kullanılarak yapıldı. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

VI. BULGULAR

A. Kontrol ve Hasta Gruplarının Demografik, Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Çalışmaya, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı polikliniğinden BH tanısıyla takipli ya da yeni BH tanısı konulmuş 30 hasta ve 10 sağlıklı birey dahil edildi.

Sağlıklı kontrol grubunun (n=10) 5 (%50)'i erkek, 5'i kadın, ve ortanca yaşları 30 (26.75-47.5) yıldı. Kontrol grubunda sigara içen sayısı 3 (%30) idi. Kan sayımlarında mutlak nötrofil sayısı 4 (3.2-4.6) 10^3/µl idi; akut faz yanıtı göstergelerinden serum CRP değeri 1.35 (0.55-2.32) mg/l ve ESH değeri 4 (4-6) mm/saat olarak saptandı. Kontrol grubu ile total BH grubu (n=30) cinsiyet, yaş ve sigara içimi açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı (p=0.444, p=0.988, p=1.000).

Aktif durumda iken örnek alınan hastaların (n=30) 22'sinin sistemik aktivasyonu, 8 hastanın ise izole oral aktivasyonu vardı. İnaktif durumda iken örnek alınan hastaların (n=18) 15'inin sistemik aktivasyon sonrası, 8'inin ise oral aktivasyon sonrası takip örnekleri alırken, daha önce aktivasyonu olup inaktif dönemde örnek alınan izole oral inaktif 3 hasta vardı. Aktif ve inaktif dönemde örnek alınan hasta gruplarının demografik, klinik ve laboratuar özellikleri Tablo-2 ve Tablo-3'de özetlenmiştir.

Total aktif grup (n=30)'un 21 (%70)'i erkek, ortanca yaşı 34.5 (26.5-42) yıl, takip süresi 54 (10.5-150) aydı. Altı (%20) hastanın aile öyküsü mevcuttu ve 10 (%76.9) hasta HLA-B*51 taşıyordu. Hastaların 3 (%10)'ünde ek hastalık (diyabet, hipertansiyon veya hiperlipidemiden en az biri) mevcuttu. Sigara içen hasta sayısı 8 (%26.7) idi. Hastaların 29 (%96.7)'u ISG-1990 kriterlerini karşılıyordu. Kümülatif hastalık tutulum özelliklerinden tekrarlayan oral aft (TOA) 30 (%100), genital ülser (GÜ) 24 (%80), papillopüstüler lezyon (PPL) 23 (%76.7), eritema nodosum (EN) benzeri lezyon 10 (%33.3), paterji reaksiyonu 19 (%73.1), eklem tutulumu 12 (%40), göz tutulumu 8 (%26.7), nörolojik tutulum 2 (%6.7), gastrointestinal sistem (GİS) tutulumu 1 (%3.3), vasküler tutulum 7 (%23.3) ve diğer tutulumlar 1 (%3.3) hastada mevcuttu. Hastaların 7 (%23.3)'si tedavi naif, 23 (%76.7)'ü kolşisin, 7 (%23.3)'si azatioprin ve 3 (%10)'ü glukokortikoid tedavi almaktaydı. Laboratuvar değerlerinden nötrofil sayısı 6.5 ± 2.6 10^3/µl, CRP 7.5 (3.16-26.5) mg/l ve ESH değeri 10.5 (7-23.25) mm/saat olarak saptandı.

Sistemik aktif grup (n=22)'un 16 (%72.7)'sı erkek, ortalama yaşı 34.8 ± 10.1 yıl, ortanca takip süresi 48 (8.75-181.75) aydı. 4 (%18.2) hastanın aile öyküsü mevcuttu ve 7 (%77.8) hasta HLA-B*51 taşıyordu. Hastaların 2 (%9.1)'sinde ek hastalık (diyabet, hipertansiyon veya hiperlipidemiden en az biri) mevcuttu. Sigara içen hasta sayısı 7 (%31.8) idi. Hastaların 21

	Total grup (n=30)	Sistemik grup (n=22)	Oral grup (n=15)
Cinsiyet, erkek, n (%)	21 (70)	16 (72.7)	9 (60)
Yaş, yıl	34.5 (26.5-42)	34.8 ± 10.1	35 (28-47)
Takip süresi, ay	54 (10.5-150)	48 (8.75-181.75)	66 (8-140)
Aile öyküsü, n (%)	6 (20)	4 (18.2)	4 (26.7)
HLA B51, n (%)	10/13 (76.9)	7/9 (77.8)	5/7 (71.4)
Ek hastalık, n (%)	3 (10)	2 (9.1)	1 (6.7)
Sigara, n (%)	8 (26.7)	7 (31.8)	4 (26.7)
ISG kriteri, n (%)	29 (96.7)	21 (95.5)	14 (93.3)
Hastalık tutulumları, n (%)			
TOA	30 (100)	22 (100)	15 (100)
Genital ülser	24 (80)	17 (77.3)	11 (73.3)
PPL	23 (76.7)	17 (77.3)	12 (80)
EN benzeri lezyon	10 (33.3)	8 (36.4)	6 (40)
Paterji reaksiyonu	19/26 (73.1)	15/19 (78.9)	11/14 (78.6)
Eklem tutulumu	12 (40)	9 (40.9)	5 (33.3)
Göz tutulumu	8 (26.7)	7 (31.8)	2 (13.3)
Nörolojik tutulum	2 (6.7)	2 (9.1)	0 (0)
Parankimal	1 (3.3)	1 (4.5)	0 (0)
Vasküler	1 (3.3)	1 (4.5)	0 (0)
GİS tutulumu	1 (3.3)	1 (4.5)	1 (6.7)
Vasküler	7 (23.3)	7 (31.8)	2 (13.3)
Venöz	6 (20)	6 (27.3)	1 (6.7)
Arteriyel	2 (6.7)	2 (9.1)	1 (6.7)
Diğer	1 (3.3)	1 (4.5)	0 (0)
Tedavi, n (%)			
Tedavi naif	7 (23.3)	6 (27.3)	4 (26.7)
Kolşisin	23 (76.7)	16 (72.7)	11 (73.3)
Azatiopurin	7 (23.3)	6 (27.3)	1 (6.7)
Kortikosteroid	3 (10)	3 (13.6)	0 (0)
Laboratuvar değerleri			
Nötrofil sayısı, 10^3/µl	6.5 ± 2.6	7.1 ± 2.6	5.9 (4.8-6.8)
CRP, mg/l	7.5 (3.16-26.5)	10.75 (4.03-50)	7.51 (4.28-22)
ESH, mm/saat	10.5 (7-23.25)	11.5 (7.75-38)	13 (6-23)

Tablo-2. Aktif dönemde örnek alınan hastaların demografik, klinik ve laboratuar özellikleri. Total grup: aktif dönemde örnek alınan hastaların tümü, Sistemik grup: aktif dönemde iken sistemik hastalık bulgusu olan örnek alınan hasta grubu, Oral grup: aktif dönemde iken oral aftı olan örnek alınan hasta grubu. (ISG: uluslararası çalışma grubu, TOA: tekrarlayan oral aft, PPL: papülopüstüler lezyon, EN: eritema nodosum, GİS: gastrointestinal sistem, CRP: c-reaktif protein, ESH: eritrosit sedimentasyon hızı)

	Total grup (n=18)	Sistemik grup (n=15)	Oral grup (n=8)
Cinsiyet, erkek, n (%)	11 (61.1)	9 (60)	4 (50)
Yaş, yıl	36.5 ± 9.1	36.2 ± 9.51	39 (32.75-47.75)
Takip süresi, ay	48 (10.25-70.5)	42 (8-66)	54 (16.5-75.5)
Aile öyküsü, n (%)	4 (22.2)	3 (20)	3 (37.5)
HLA B51, n (%)	9/12 (75)	7/9 (77.8)	4/6 (66.7)
Ek hastalık, n (%)	2 (11.1)	1 (6.7)	1 (12.5)
Sigara, n (%)	7 (38.9)	6 (40)	4 (50)
ISG kriteri, n (%)	17 (94.4)	14 (93.3)	7 (87.5)
Hastalık tutulumları, n (%)			
TOA	18 (100)	15 (100)	8 (100)
Genital ülser	14 (77.8)	11 (73.3)	6 (75)
PPL	12 (66.7)	11 (73.3)	5 (62.5)
EN benzeri lezyon	8 (44.4)	7 (46.7)	4 (50)
Paterji reaksiyonu	12/16 (75)	11/14 (78.6)	6/7 (85.7)
Eklem tutulumu	8 (44.4)	6 (40)	4 (50)
Göz tutulumu	2 (11.1)	2 (13.3)	0 (0)
Nörolojik tutulum	1 (5.6)	1 (6.7)	0 (0)
Parankimal	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Vasküler	1 (5.6)	1 (6.7)	0 (0)
GİS tutulumu	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Vasküler	6 (33.3)	6 (40)	2 (25)
Venöz	5 (27.8)	5 (33.3)	1 (12.5)
Arteriyel	1 (5.6)	1 (6.7)	1 (12.5)
Diğer	1 (5.6)	1 (6.7)	0 (0)
Tedavi, n (%)			
Kolşisin	18 (100)	15 (100)	8 (100)
Azatiopurin	10 (55.6)	10 (66.7)	3 (37.5)
Kortikosteroid	9 (50)	8 (53.3)	3 (37.5)
TNFi	1 (5.6)	1 (6.7)	0 (0)
Laboratuar değerleri			
Nötrofil sayısı, 10^3/µl	4.7 (3.4-6.6)	4.2 (3.3-6.5)	5.1 (3.6-6.4)
CRP, mg/l	2.44 (0.6-4.46)	2.21 (0.61-4.46)	1.80 (0.48-4.01)
ESH, mm/saat	9 (3-15)	5 (3-15)	14.5 (4-15.75)

Tablo-3. İnaktif dönemde örnek alınan hastaların demografik, klinik ve laboratuar özellikleri. Total grup: inaktif dönemde iken örnek alınan hastaların tümü, Sistemik grup: aktif dönemde iken sistemik hastalık bulgusu olup remisyona girdiğinde örnek alınan hasta grubu, Oral grup: aktif dönemde iken oral aftı olup remisyona girdiğinde örnek alınan hasta grubu. (ISG: uluslararası çalışma grubu, TOA: tekrarlayan oral aft, PPL: papülopüstüler lezyon, EN: eritema nodosum, GİS: gastrointestinal sistem, CRP: c-reaktif protein, ESH: eritrosit sedimentasyon hızı, TNFi: tümor nekrozis faktor inhibitörü)

(%95.5)'i ISG-1990 kriterlerini karşılıyordu. Kümülatif hastalık tutulum özelliklerinden TOA 22 (%100), GÜ 17 (%77.3), PPL 17 (%77.3), EN benzeri lezyon 8 (%36.4), paterji reaksiyonu 15 (%78.9), eklem tutulumu 9 (%40.9), göz tutulumu 7 (%31.8), nörolojik tutulum 2 (%9.1), GİS tutulumu 1 (%4.5), vasküler tutulum 7 (%31.8) ve diğer tutulumlar 1 (%4.5) hastada mevcuttu. Hastaların 6 (%27.3)'sı tedavi naif, 16 (%72.7)'sı kolşisin, 6 (%27.3)'sı azatioprin ve 3 (%13.6)'ü glukokortikoid tedavisi almaktaydı. Laboratuvar değerlerinden nötrofil sayısı 7.1 ± 2.6 10^3/µl, CRP 10.75 (4.03-50) mg/l ve ESH değeri 11.5 (7.75-38) mm/saat olarak saptandı.

Oral aktif grup (n=15)'un 9 (%60)'u erkek, ortanca yaşı 35 (28-47) yıl, takip süresi 66 (8-140) aydı. Dört (%26.7) hastanın aile öyküsü mevcuttu ve 5 (%71.4) hasta HLA-B*51 taşıyordu. Hastaların 1 (%6.7)'inde ek hastalık (diyabet, hipertansiyon veya hiperlipidemiden en az biri) mevcuttu. Sigara içen hasta sayısı 4 (%26.7) idi. Hastaların 14 (%93.3)'ü ISG-1990 kriterlerini karşılıyordu. Kümülatif hastalık tutulum özelliklerinden TOA 15 (%100), GÜ 11 (%77.3), PPL 12 (%80), EN benzeri lezyon 6 (%40), paterji reaksiyonu 11 (%78.6), eklem tutulumu 5 (%33.3), göz tutulumu 2 (%13.3), GİS tutulumu 1 (%6.7), vasküler tutulum 2 (%13.3) hastada mevcuttu. Hastaların 4 (%26.7)'ü tedavi naif, 11 (%73.3)'i kolşisin, 1 (%6.7)'i azatioprin tedavisi almaktaydı. Laboratuvar değerlerinden nötrofil sayısı 5.9 (4.8-6.8) 10^3/µl, CRP 7.51 (4.28-22) mg/l ve ESH değeri 13 (6-23) mm/saat olarak saptandı.

Total inaktif grup (n=18)'un 11 (%61.1)'i erkek, ortalama yaşı 36.5 ± 9.1 yıl, ortanca takip süresi 48 (10.25-70.5) aydı. Dört (%22.2) hastanın aile öyküsü mevcuttu ve 9 (%75) hasta HLA-B*51 taşıyordu. Hastaların 2 (%11.1)'sinde ek hastalık (diyabet, hipertansiyon veya hiperlipidemiden en az biri) mevcuttu. Sigara içen hasta sayısı 7 (%38.9) idi. Hastaların 17 (%94.4)'si ISG-1990 kriterlerini karşılıyordu. Kümülatif hastalık tutulum özelliklerinden TOA 18 (%100), GÜ 14 (%77.8), PPL 12 (%66.7), EN benzeri lezyon 8 (%44.4), paterji reaksiyonu 12 (%75), eklem tutulumu 8 (%44.4), göz tutulumu 2 (%11.1), nörolojik tutulum 1 (%5.6), vasküler tutulum 6 (%33.3) ve diğer tutulumlar 1 (%5.6) hastada mevcuttu. Hastaların 18 (%100)'i kolşisin, 10 (%55.6)'u azatioprin ve 9 (%50)'u glukokortikoid ve 1 (%5.6)'i TNFi tedavisi almaktaydı. Laboratuvar değerlerinden nötrofil sayısı 4.7 (3.4-6.6) 10^3/µl, CRP 2.44 (0.6-4.46) mg/l ve ESH 9 (3-15) değeri mm/saat olarak saptandı.

Sistemik inaktif grup (n=15)'un 9 (%60)'u erkek, ortalama yaşı 36.2 ± 9.51 yıl, ortanca takip süresi 42 (8-66) aydı. Üç (%20) hastanın aile öyküsü mevcuttu ve 7 (%77.8) hasta HLA-B*51 taşıyordu. Hastaların 1 (%6.7)'inde ek hastalık (diyabet, hipertansiyon veya hiperlipidemiden en az biri) mevcuttu. Sigara içen hasta sayısı 6 (%40) idi. Hastaların 14 (%93.3)'ü ISG-1990 kriterlerini karşılıyordu. Kümülatif hastalık tutulum özelliklerinden TOA

15 (%100), GÜ 11 (%73.3), PPL 11 (%73.3), EN benzeri lezyon 7 (%46.7), paterji reaksiyonu 11 (%78.6), eklem tutulumu 6 (%40), göz tutulumu 2 (%13.3), nörolojik tutulum 1 (%6.7), vasküler tutulum 6 (%40) ve diğer tutulumlar 1 (%6.7) hastada mevcuttu. Hastaların 15 (%100)'i kolşisin, 10 (%66.7)'u azatioprin ve 8 (%53.3)'i glukokortikoid ve 1 (%6.7)'i TNFi tedavisi almaktaydı. Laboratuvar değerlerinden nötrofil sayısı 4.2 (3.3-6.5) 10^3/µl, CRP 2.21 (0.61-4.46) mg/l ve ESH 5 (3-15) değeri mm/saat olarak saptandı.

Oral inaktif grup (n=8)'un 4 (%50)'ü erkek, ortanca yaşı 39 (32.75-47.75) yıl, takip süresi 54 (16.5-75.5) aydı. Üç (%37.5) hastanın aile öyküsü mevcuttu ve 4 (%66.7) hasta HLA-B*51 taşıyordu. Hastaların 1 (%12.5)'inde ek hastalık (diyabet, hipertansiyon veya hiperlipidemiden en az biri) mevcuttu. Sigara içen hasta sayısı 4 (%50) idi. Hastaların 7 (%87.5)'si ISG-1990 kriterlerini karşılıyordu. Kümülatif hastalık tutulum özelliklerinden TOA 8 (%100), GÜ 6 (%75), PPL 5 (%62.5), EN benzeri lezyon 4 (%50), paterji reaksiyonu 6 (%85.7), eklem tutulumu 4 (%50), vasküler tutulum 2 (%25) hastada mevcuttu. Hastaların 8 (%100)'i kolşisin, 3 (%37.5)'ü azatioprin ve 3 (%37.5)'ü glukokortikoid tedavisi almaktaydı. Laboratuvar değerlerinden nötrofil sayısı 5.1 (3.6-6.4) 10^3/µl, CRP 1.80 (0.48-4.01) mg/l ve ESH 14.5 (4-15.75) değeri mm/saat olarak saptandı.

Oral aktif iken tükürük örneği alınan hastaların (n=15) aktif durumda iken aft sayısı 1 (1-3) adetti ve aft tiplerinden minör aft 11 (%73.3), majör aft 4 (%26.7) hastada mevcuttu. Aft süresi 4 (2-7) gün ve aft tekrarlama sıklığı yılda 6 (5-12) atak idi. Oral inaktif iken tükürük örneği alınan grubun aktif durumda iken aft sayısı 2 (1-4) adetti ve aft tiplerinden minör aft 5 (%71.4), majör aft ise 2 (%28.6) hastada mevcuttu. Aft süresi 4 (3-7) gün iken aft tekrarlama sıklığı yılda 7 (4-12) atak idi (Tablo-4).

	Oral aktif grup (n=15)	**Oral inaktif grup (n=7)**
Aft sayısı, n	1 (1-3)	2 (1-4)
Aft tipi, n (%)		
Minor	11 (73.3)	5 (71.4)
Major	4 (26.7)	2 (28.6)
Herpetiform	0 (0)	0 (0)
Aft süresi, gün	4 (2-7)	4 (3-7)
Aft tekrarlama sıklığı, atak/yıl	6 (5-12)	7 (4-12)

Tablo-4. Oral aktif ve inaktif durumda (aktif olduğu andaki) iken tükürük örneği alınan hastaların oral aft özellikleri. (Oral aktif grup: aktif dönemde iken oral aftı olup tükürük örneği alınan hasta grubu, Oral inaktif grup: oral aftı olup remisyona girdiğinde tükürük örneği alınan hasta grubu)

B. Serum NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması

1. Kontrol ile Hasta Gruplarının Serum cf-DNA Düzeylerinin Karşılaştırılması

Serum cf-DNA düzeyi kontrol grubunda (n=10) 3115 (2780-3202) ng/ml, total aktif grupta (n=30) 3980 (3540-4337) ng/ml, sistemik aktif grupta (n=22) 4057 ± 667 ng/ml, oral aktif grupta (n=15) 3772 ± 474 ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 3680 (3497-3900) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total aktif grup, sistemik aktif grup, oral aktif grup ve izole oral aktif grubun serum cf-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak hasta grupları lehine anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.001$). Sistemik aktif grup ile izole oral grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.205$) (Şekil-3A). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda aktif durumda (n=6) 3875 ± 574 ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak hasta grubu lehine anlamlı fark saptandı ($p=0.007$) (Şekil-7A).

Düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyi kontrol grubunda (n=10) 818 ± 240 ng/ml, total aktif grupta (n=30) 667 (477-806) ng/ml, sistemik aktif grupta (n=22) 639 (448-738) ng/ml, oral aktif grupta (n=15) 677 (522-725) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 718 (663-1145) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total aktif grup, oral aktif grup ve izole oral aktif grubun düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmazken ($p=0.134$, $p=0.222$, $p=0.929$); sistemik aktif grup ile karşılaştırıldığında kontrol grubu istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p=0.046$). Sistemik aktif grup ile izole oral aktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.075$) (Şekil-3B). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda aktif durumda (n=6) 475 (385-940) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.129$) (Şekil-8A).

Serum cf-DNA düzeyi kontrol grubunda (n=10) 3115 (2780-3202) ng/ml, total inaktif grupta (n=18) 3085 (3007-3292) ng/ml, sistemik inaktif grupta (n=15) 3060 (3000-3260) ng/ml, oral inaktif grupta (n=8) 3090 (3050-3372) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 3410 (3230-3530) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total inaktif grup, sistemik inaktif grup, oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun serum cf-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.388$, $p=0.579$, $p=0.450$, $p=0.176$). Sistemik aktif grup ile izole aktif oral grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.154$) (Şekil-3C). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda inaktif durumda (n=5) 3120 (3055-3320) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.270$) (Şekil-7A).

Düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyi kontrol grubunda (n=10) 818 ± 240 ng/ml, total inaktif grupta (n=18) 684 (463-865) ng/ml, sistemik inaktif grupta (n=15) 776 (469-865) ng/ml, oral inaktif grupta (n=8) 672 (482-861) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 568 (484-708) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total inaktif grup, sistemik inaktif grup, oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.250, p=0.375, p=0.214, p=0.176). Sistemik inaktif grup ile izole oral inaktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.441) (Şekil-3D). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda inaktif durumda (n=5) 529 (482-970) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.426) (Şekil-8A).

2. Kontrol ile Hasta Gruplarının Serum NE Düzeylerinin Karşılaştırılması

Serum NE düzeyi kontrol grubunda (n=10) 2.9 ± 1.41 ng/ml, total aktif grupta (n=30) 5.06 (3.39-5.97) ng/ml, sistemik aktif grupta (n=22) 4.84 (3.2-5.82) ng/ml, oral aktif grupta (n=15) 5.15 ± 2.1 ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 5.84 (4.43-6.73) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total aktif grup, sistemik aktif grup, oral aktif grup ve izole oral aktif grubun serum NE düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak hasta grupları lehine anlamlı farklılık saptandı (p=0.012, p=0.038, p=0.007, p=0.010). Sistemik aktif grup ile izole oral aktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.091) (Şekil-4A). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda aktif durumda (n=6) 4.07 (2.30-4.98) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.329) (Şekil-7B).

Düzeltilmiş serum NE düzeyi kontrol grubunda (n=10) 0.68 (0.43-1.05) ng/ml, total aktif grupta (n=30) 0.77 (0.43-1.28) ng/ml, sistemik aktif grupta (n=22) 0.65 (0.34-1.02) ng/ml, oral aktif grupta (n=15) 0.94 (0.23-0.94) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 1.28 ± 0.67 ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total aktif grup, sistemik aktif grup, oral aktif grup ve izole oral aktif grubun düzeltilmiş serum NE düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.685, p=0.776, p=0.222, p=0.076). Sistemik aktif grup ile izole oral aktif grup karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı olarak izole oral aktif grup lehine fark saptandı (p=0.022) (Şekil-4B). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda aktif durumda (n=6) iken 0.52 (0.23-1.36) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.664) (Şekil-8B).

Serum NE düzeyi kontrol grubunda (n=10) 2.9 ± 1.41 ng/ml, total inaktif grupta (n=18) 4.56 (3.30-5.80) ng/ml, sistemik inaktif grupta (n=15) 4.51 (3.42-5.78) ng/ml, oral inaktif

grupta (n=8) 5.17 (2.16-6.24) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 5.02 (3.25-5.76) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total inaktif grup ve sistemik inaktif grubun serum NE düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak hasta grupları lehine anlamlı farklılık saptanırken (p=0.027, p=0.026); oral inaktif grup ve izole oral inaktif grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.076, p=0.310). Sistemik inaktif grup ile izole oral inaktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.953) (Şekil-4 C). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda inaktif durumda (n=5) 3.42 (2.18-4.25) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.624) (Şekil-7B).

Düzeltilmiş serum NE düzeyi kontrol grubunda (n=10) 0.68 (0.43-1.05) ng/ml, total inaktif grupta (n=18) 0.99 (0.42-1.54) ng/ml, sistemik inaktif grupta (n=15) 0.84 (0.45-1.54) ng/ml, oral inaktif grupta (n=8) 0.84 (0.45-1.54) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 0.85 (0.55-1.01) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total inaktif grup, sistemik inaktif grup, oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun düzeltilmiş serum NE düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.415, p=0.375, p=0.594, p=1.000). Sistemik inaktif grup ile izole oral inaktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.441) (Şekil-4D). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda inaktif durumda (n=5) 0.57 (0.33-1.32) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.903) (Şekil-8B).

3. Kontrol ile Hasta Gruplarının Serum MPO Düzeylerinin Karşılaştırılması

Serum MPO düzeyi kontrol grubunda (n=10) 28.83 (23.66-30.30) ng/ml, total aktif grupta (n=30) 20.96 (16.40-31.19) ng/ml, sistemik aktif grupta (n=22) 24.48 (17.10-31.54) ng/ml, oral aktif grupta (n=15) 19.77 (14.5-28.53) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 18.36 (14.68-24.58) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile oral aktif grup ve izole oral aktif grubun serum MPO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol lehine anlamlı farklılık saptanırken (p=0.035, p=0.016); total aktif grup ve sistemik aktif grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.126, p=371). Sistemik aktif grup ile izole oral aktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.189) (Şekil-5A). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda aktif durumda (n=6) 19.14 (17.05-33.2) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.233) (Şekil-7C).

Düzeltilmiş serum MPO düzeyi kontrol grubunda (n=10) 6.91 (5.94-8.09) ng/ml, total aktif grupta (n=30) 3.66 (2.4-5.24) ng/ml, sistemik aktif grupta (n=22) 3.36 (2.30-5.04) ng/ml,

oral aktif grupta (n=15) 3.73 (2.71-5.50) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 4.23 (3.29-5.58) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total aktif grup, sistemik aktif grup, oral aktif grup ve izole oral aktif grubun düzeltilmiş serum MPO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.003$). Sistemik aktif grup ile izole oral aktif grup karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.325$) (Şekil-5B). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda aktif durumda (n=6) 3.36 (1.76-5.89) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı fark saptandı ($p=0.005$) (Şekil-8C).

Serum MPO düzeyi kontrol grubunda (n=10) 28.83 (23.66-30.30) ng/ml, total inaktif grupta (n=18) 23.80 (16.18-27.04) ng/ml, sistemik inaktif grupta (n=15) 22.33 (16.36-26.32) ng/ml, oral inaktif grupta (n=8) 23.84 (16.85-29.58) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 25.35 (19.72-27.27) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total inaktif grup ve sistemik inaktif grubun serum MPO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı farklılık saptanırken ($p=0.049$, $p=0.046$); oral inaktif grup ve izole oral inaktif grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.286$, $p=0.398$). Sistemik inaktif grup ile izole oral inaktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.953$) (Şekil-5C). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda inaktif durumda (n=5) 25.26 (16.16-28) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.178$) (Şekil-7C).

Düzeltilmiş serum MPO düzeyi kontrol grubunda (n=10) 6.91 (5.94-8.09) ng/ml, total inaktif grupta (n=18) 4.56 (3.30-5.39) ng/ml, sistemik inaktif grupta (n=15) 4.62 (3.61-5.39) ng/ml, oral inaktif grupta (n=8) 4.96 (3.48-6.42) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 3.33 (2.84-5.06) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total inaktif grup, sistemik inaktif grup ve oral inaktif grubun düzeltilmiş serum MPO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı farklılık saptanırken ($p=0.001$, $p=0.001$, $p=0.010$); izole oral inaktif grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.091$). Sistemik inaktif grup ile izole oral inaktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.594$) (Şekil-5D). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda inaktif durumda (n=5) 4.5 (3.85-5.16) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı fark saptandı ($p=0.003$) (Şekil-8C).

4. Kontrol ile Hasta Gruplarının Serum cit-H3 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Serum cit-H3 düzeyi kontrol grubunda (n=10) 11.62 (6.61-13.73) ng/ml, total aktif grupta (n=30) 5.69 (2.87-12.25) ng/ml, sistemik aktif grupta (n=22) 5.69 (2.87-13.02) ng/ml,

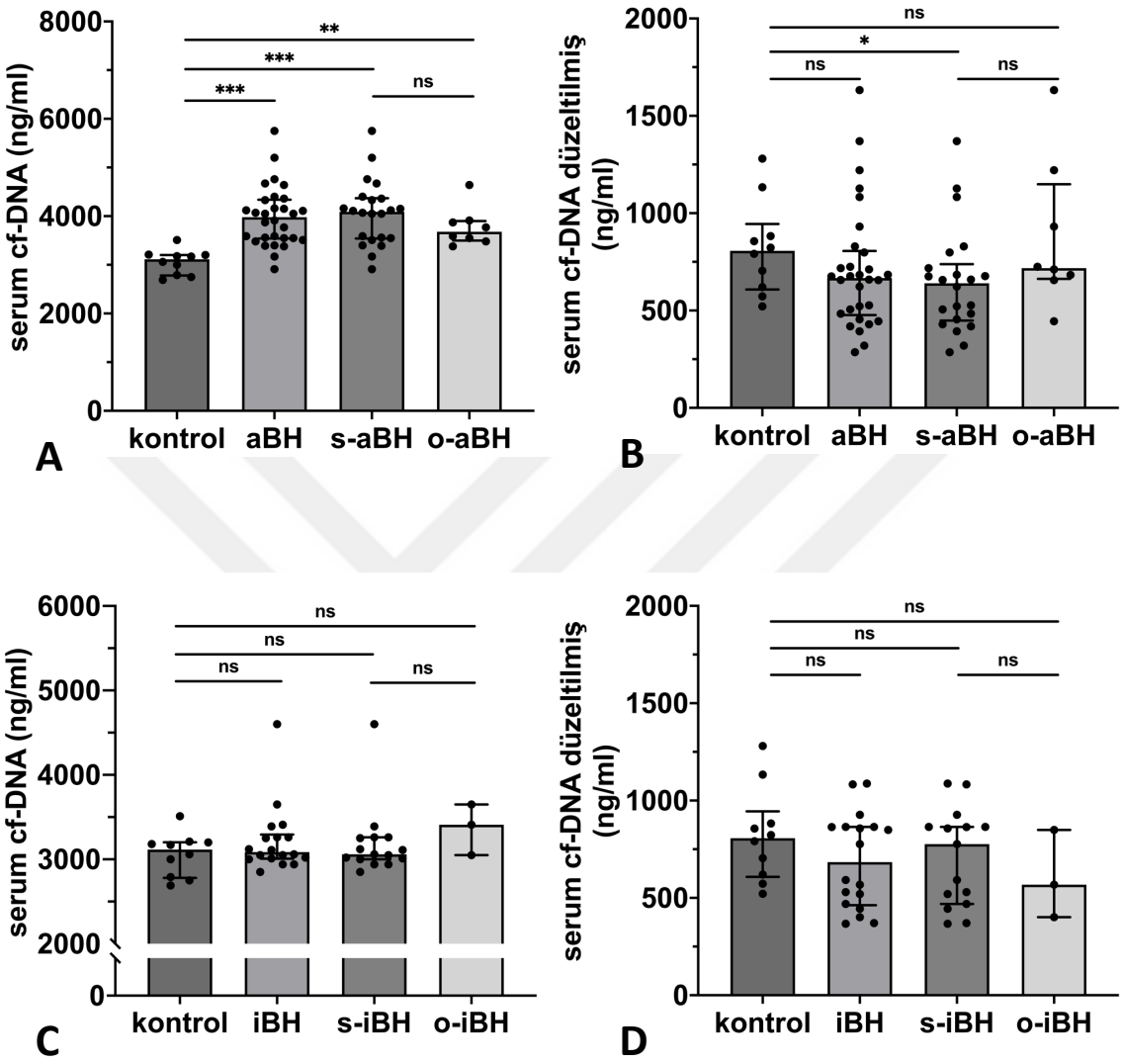
oral aktif grupta (n=15) 5.45 (2.01-8.12) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 5.41 (1.99-8.02) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total aktif grup, sistemik aktif grup, oral aktif grup ve izole oral aktif grubun serum cit-H3 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak hasta grupları lehine anlamlı farklılık saptandı (p=0.092, p=0.193, p=0.059, p=0.051). Sistemik aktif grup ile izole oral aktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.453) (Şekil-6A). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda aktif durumda (n=6) iken 4.95 (3.84-7.44) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.051) (Şekil-7D).

Düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyi kontrol grubunda (n=10) 3.07 (1.38-3.69) ng/ml, total aktif grupta (n=30) 0.95 (0.36-1.72) ng/ml, sistemik aktif grupta (n=22) 0.95 (0.36-1.72) ng/ml, oral aktif grupta (n=15) 0.87 (0.33-1.93) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 1.06 (0.35-1.87) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total aktif grup, sistemik aktif grup, oral aktif grup ve izole oral aktif grubun düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı farklılık saptandı (p=0.005, p=0.007, p=0.009, p=0.041). Sistemik aktif grup ile izole oral aktif grup karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (p=1.000) (Şekil-6B). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda aktif durumda (n=6) iken 0.88 (0.46-1.28) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı fark saptandı (p=0.007) (Şekil-8D).

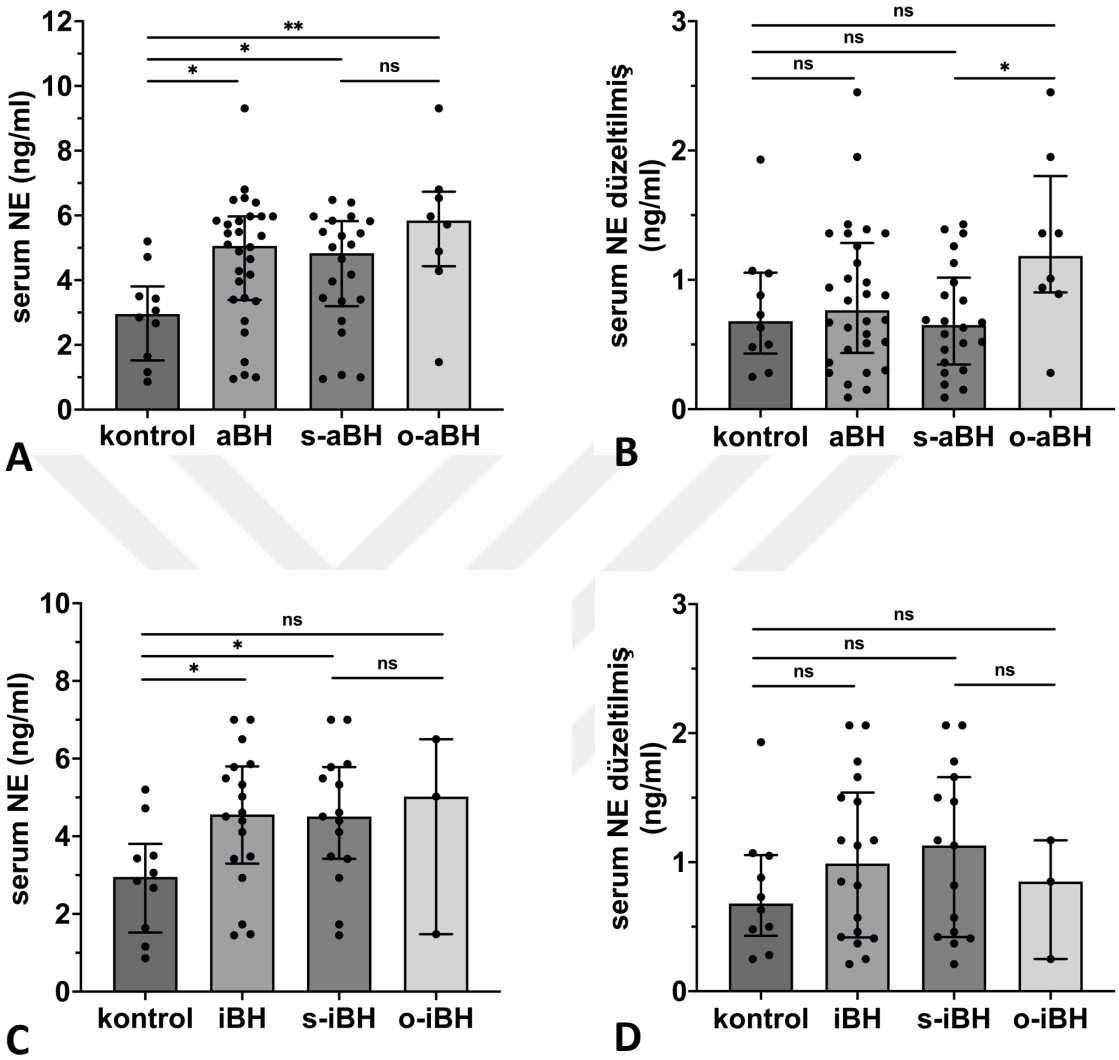
Serum cit-H3 düzeyi kontrol grubunda (n=10) 11.62 (6.61-13.73) ng/ml, total inaktif grupta (n=18) 7.36 (5.03-10.30) ng/ml, sistemik inaktif grupta (n=15) 7.16 (3.99-9.46) ng/ml, oral inaktif grupta (n=8) 7.52 (4.34-11.20) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 9.84 (7.61-10.75) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total inaktif grup, sistemik inaktif grup, oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun serum cit-H3 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.195, p=0.222, p=0.248, p=0.398). Sistemik inaktif grup ile izole oral inaktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.514) (Şekil-6C). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda inaktif durumda (n=5) 9.06 (6.24-14.61) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.624) (Şekil-7D).

Düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyi kontrol grubunda (n=10) 3.07 (1.38-3.69) ng/ml, total inaktif grupta (n=18) 1.63 (0.89-2.06) ng/ml, sistemik inaktif grupta (n=15) 1.79 (0.88-2.03) ng/ml, oral inaktif grupta (n=8) 1.64 (0.88-2.54) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 1.29 (1.09-2.00) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total inaktif grup ve oral inaktif grubun düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı farklılık saptanırken (p=0.035, p=0.041); sistemik inaktif grup ve izole inaktif grup

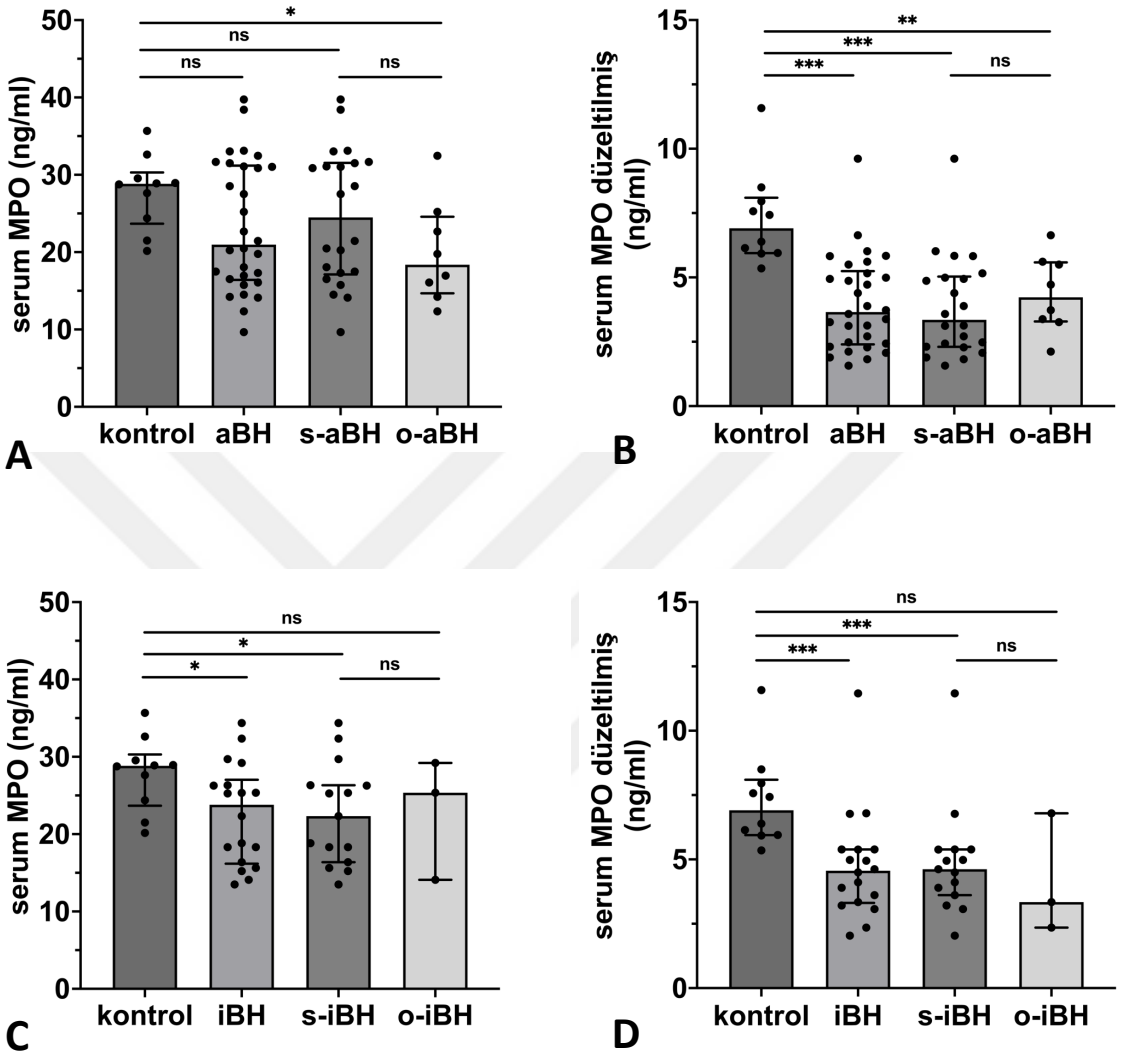
kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.067, p=0.063). Sistemik inaktif grup ile izole oral inaktif grup karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.953) (Şekil-6D). Vasküler tutulumu olan hasta grubunda inaktif durumda (n=5) 1.82 (1.39-2.65) ng/ml olarak ölçüldü ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.327) (Şekil-8D).



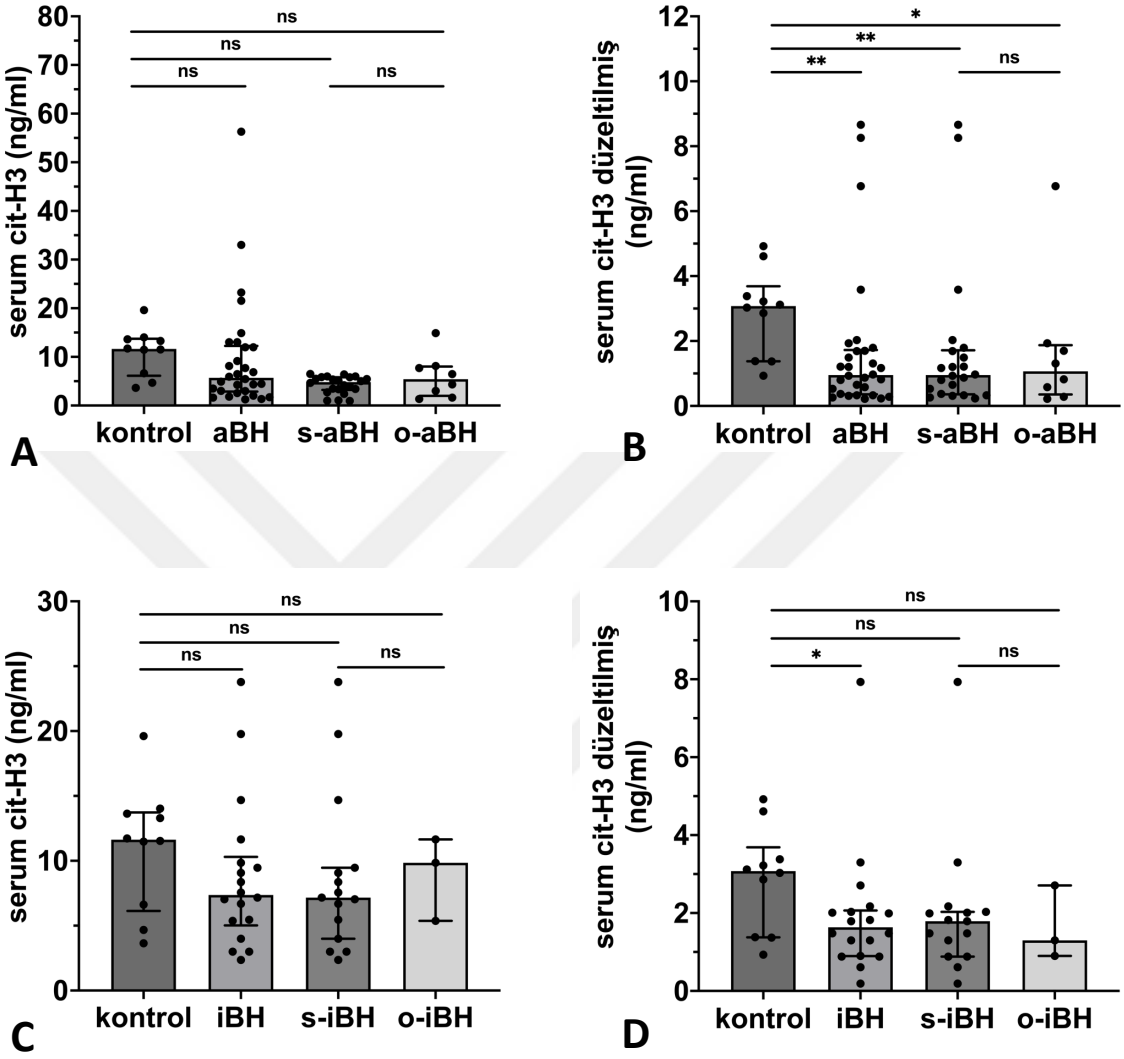
Şekil-3. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında serum cf-DNA ve düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyleri. A. Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında serum cf-DNA düzeyleri. **B.** Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyleri. **C.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında serum cf-DNA düzeyleri. **D.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; *$p<0.05$, **$p\leq0.01$, ***$p\leq0.001$, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, aBH: aktif BH, s-aBH: sistemik aktif BH, o-aBH: izole oral aktif BH, iBH: inaktif BH, s-iBH: sistemik inaktif BH, o-iBH: izole oral inaktif BH)



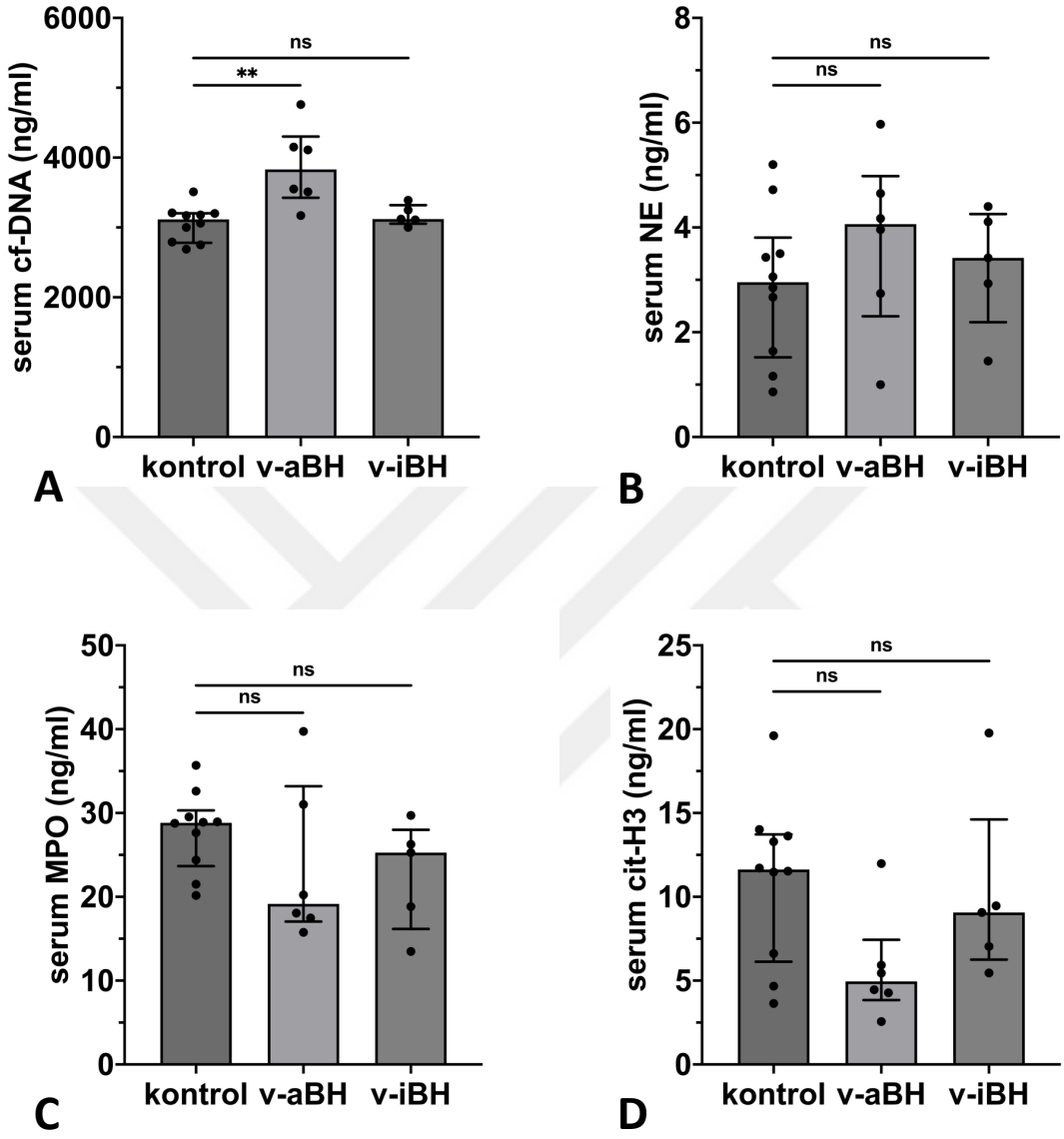
Şekil-4. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında serum NE ve düzeltilmiş serum NE düzeyleri. A. Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında serum NE düzeyleri. **B.** Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında düzeltilmiş NE düzeyleri. **C.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında serum NE düzeyleri. **D.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş serum NE düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; *p <0.05, **p≤0.01, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, NE: nötrofil elastaz, aBH: aktif BH, s-aBH: sistemik aktif BH, o-aBH: izole oral aktif BH, iBH: inaktif BH, s-iBH: sistemik inaktif BH, o-iBH: izole oral inaktif BH)



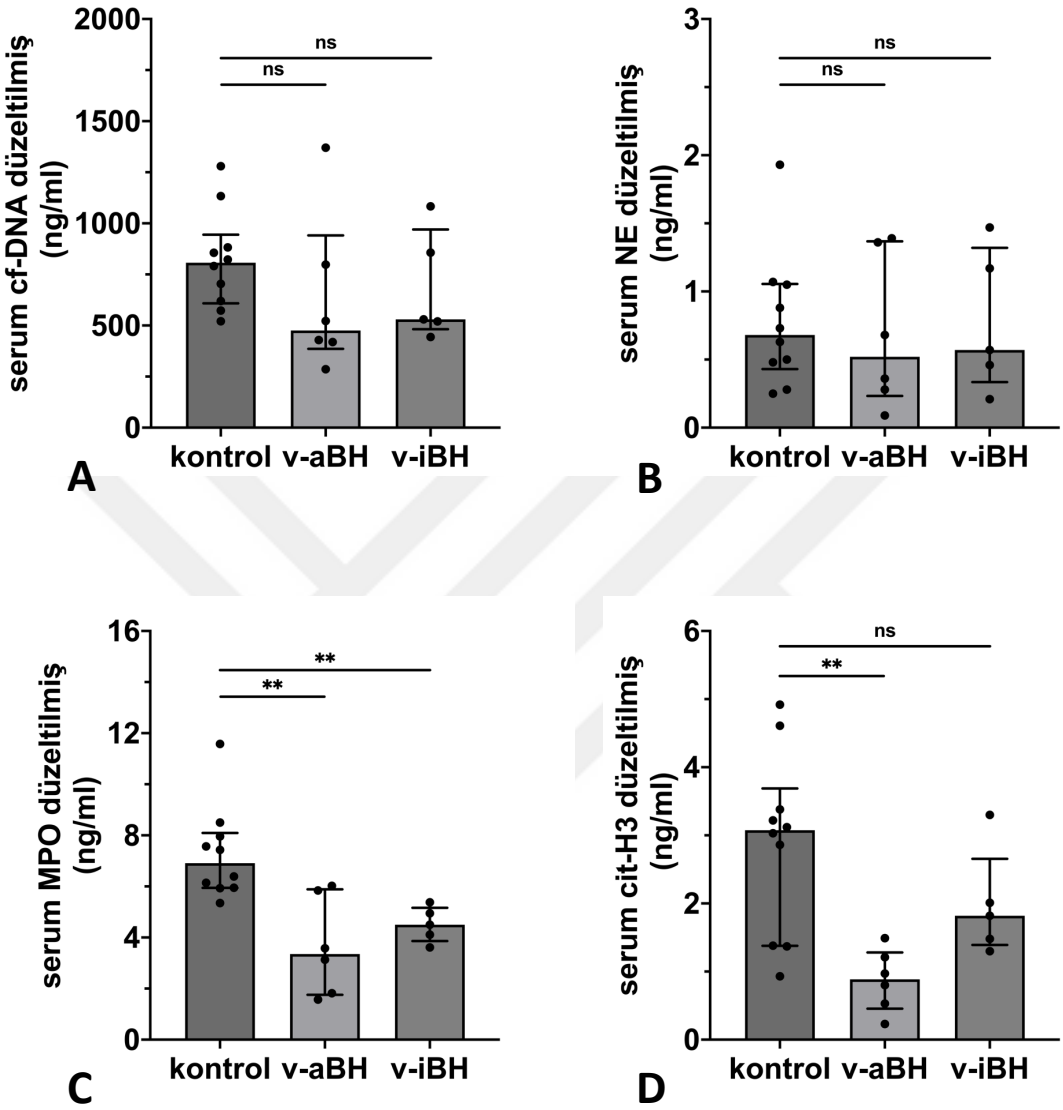
Şekil-5. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında serum MPO ve düzeltilmiş serum MPO düzeyleri. A. Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında serum MPO düzeyleri. **B.** Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında düzeltilmiş MPO düzeyleri. **C.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında serum MPO düzeyleri. **D.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş serum MPO düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; *p <0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, MPO: myeloperoksidaz, aBH: aktif BH, s-aBH: sistemik aktif BH, o-aBH: izole oral aktif BH, iBH: inaktif BH, s-iBH: sistemik inaktif BH, o-iBH: izole oral inaktif BH)



Şekil-6. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında serum cit-H3 ve düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyleri. A. Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında serum cit-H3 düzeyleri. **B.** Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında düzeltilmiş cit-H3 düzeyleri. **C.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında serum cit-H3 düzeyleri. **D.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; *p <0.05, **p≤0.01, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, aBH: aktif BH, s-aBH: sistemik aktif BH, o-aBH: izole oral aktif BH, iBH: inaktif BH, s-iBH: sistemik inaktif BH, o-iBH: izole oral inaktif BH)



Şekil-7. Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif hasta gruplarında serum NETosis biyobelirteçlerinin düzeyleri. A. Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif BH gruplarında serum cf-DNA düzeyleri. **B.** Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif BH gruplarında serum NE düzeyleri. **C.** Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif BH gruplarında serum MPO düzeyleri. **D.** Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif BH gruplarında serum cit-H3 düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; **p≤0.01, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, v-aBH: vasküler aktif BH, v-iBH: vasküler inaktif BH)



Şekil-8. Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif hasta gruplarında düzeltilmiş serum NETosis biyobelirteçlerinin düzeyleri. A. Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyleri. **B.** Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş serum NE düzeyleri. **C.** Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş serum MPO düzeyleri. **D.** Kontrol grubu, vasküler aktif ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; **p≤0.01, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, v-aBH: vasküler aktif BH, v-iBH: vasküler inaktif BH)

C. Boylamsal Takipteki Serum NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması

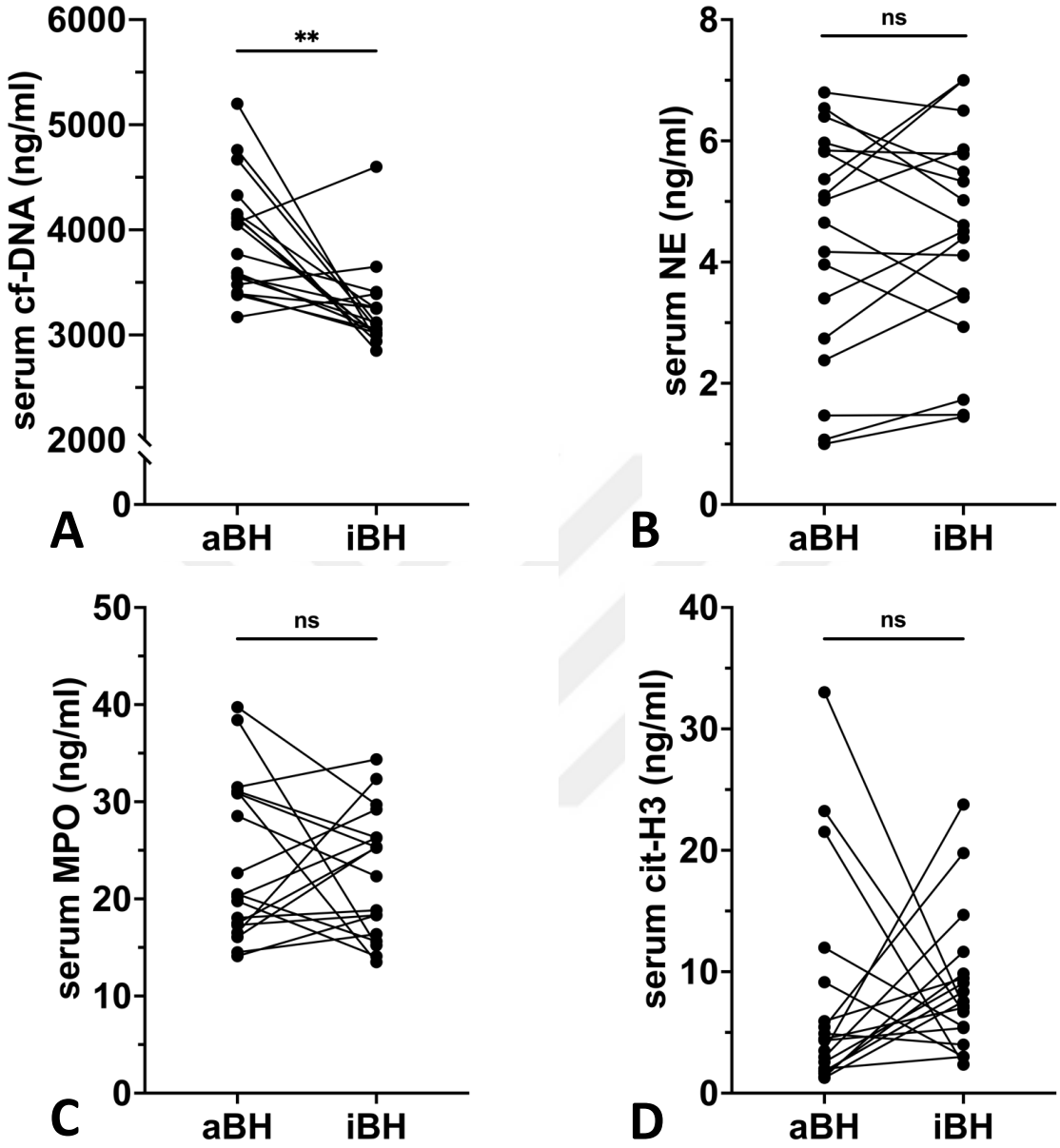
Serum cf-DNA düzeyi (n=18) aktif dönemde 3910 (3460-4195) ng/ml iken inaktif dönemde 3085 (3007-3292) ng/ml olarak ölçüldü. Serum NE düzeyi (n=18) aktif dönemde 4.84 (2.65-5.87) ng/ml iken inaktif dönemde 4.56 (3.30-5.80) ng/ml olarak ölçüldü. Serum MPO düzeyi (n=18) aktif dönemde 20.36 (17.11-31.04) ng/ml iken inaktif dönemde 23.80 (16.18-27.04) ng/ml olarak ölçüldü. Serum cit-H3 düzeyi (n=18) aktif dönemde 4.41 (1.96-9.85) ng/ml iken inaktif dönemde 7.36 (5.03-10.30) ng/ml olarak ölçüldü. Serum cf-DNA düzeyinde boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanırken (p=0.002); NE, MPO ve cit-H3 düzeylerinde boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.679, p=0.811, p=0.372) (Şekil-9).

Düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyi (n=18) aktif dönemde 667 (440-720) ng/ml iken inaktif dönemde 684 (463-865) ng/ml olarak ölçüldü. Düzeltilmiş serum NE düzeyi (n=18) aktif dönemde 0.68 (0.29-1.16) ng/ml iken inaktif dönemde 0.99 (0.42-1.54) ng/ml olarak ölçüldü. Düzeltilmiş serum MPO düzeyi (n=18) aktif dönemde 3.43 (2.24-5.20) ng/ml iken inaktif dönemde 4.56 (3.30-5.39) ng/ml olarak ölçüldü. Düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyi (n=18) aktif dönemde 0.72 (0.30-1.28) ng/ml iken inaktif dönemde 1.63 (0.89-2.06) ng/ml olarak ölçüldü. Düzeltilmiş serum cf-DNA, NE, MPO ve cit-H3 düzeyleri boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.472, p=0.133, p=0.071, p=0.094) (Şekil-10).

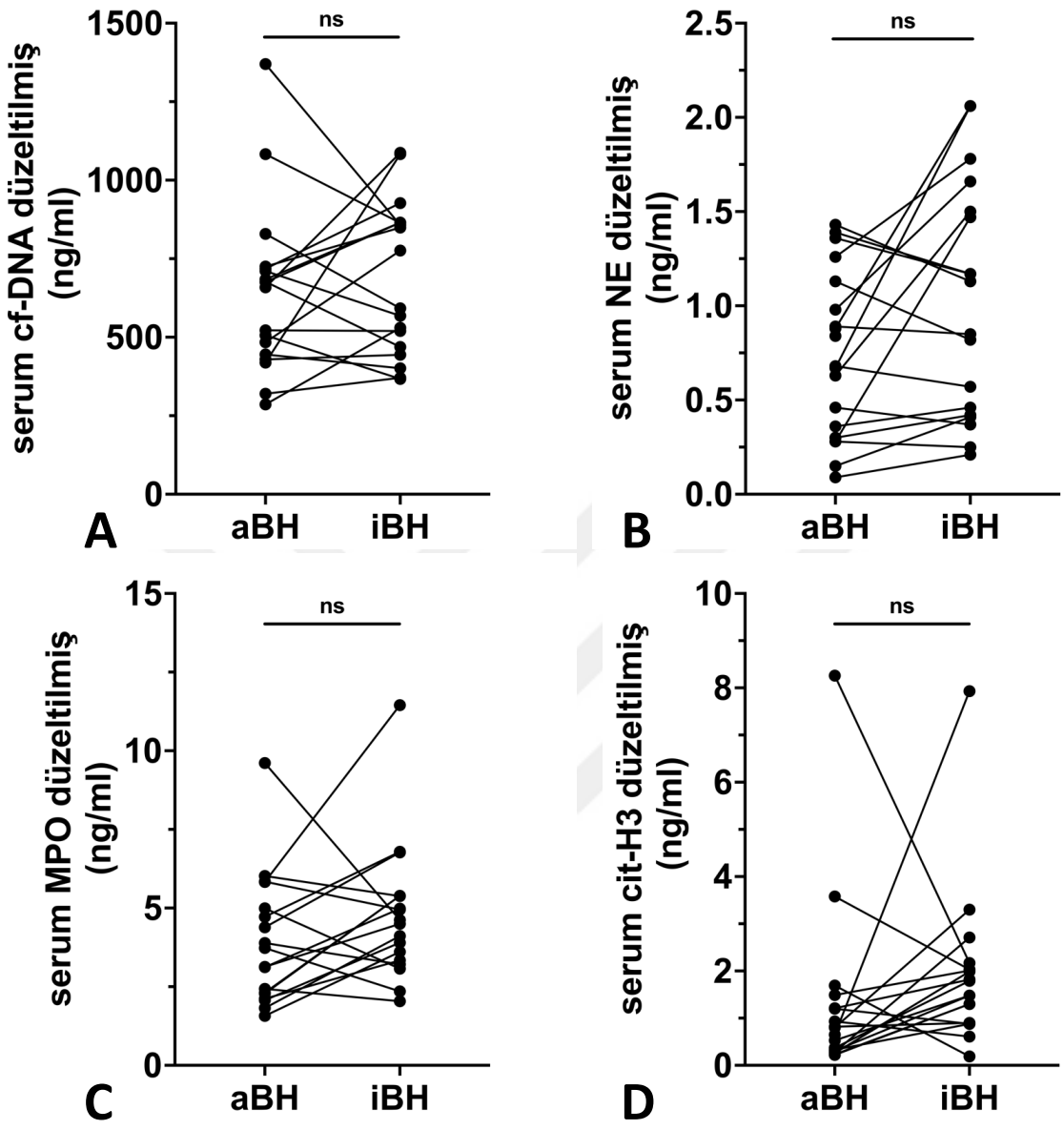
Vasküler tutulumu olan boylamsal takip serum örnekleri alınan hastalarda (n=5) serum cf-DNA düzeyi aktif dönemde 4110 (3360-4455) ng/ml iken inaktif dönemde 3120 (3055-3320) ng/ml, serum NE düzeyi aktif dönemde 3.96 (1.87-4.41) ng/ml iken inaktif dönemde 3.42 (2.19-4.26) ng/ml, serum MPO düzeyi aktif dönemde 20.24 (17.77-35.38) ng/ml iken inaktif dönemde 25.27 (16.16-27.99) ng/ml, serum cit-H3 düzeyi aktif dönemde 5.45 (3.51-8.95) ng/ml iken inaktif dönemde 9.07 (6.24-14.62) ng/ml olarak ölçüldü. Vasküler tutulumu olan hastalarda serum cf-DNA, NE, MPO ve cit-H3 düzeylerinde boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0.080, p=0.893, p=0.686, p=0.345) (Şekil-11).

Vasküler tutulumu olan boylamsal takip serum örnekleri alınan hastalarda (n=5) düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyi aktif dönemde 429 (352-946) ng/ml iken inaktif dönemde 530 (482-970) ng/ml, düzeltilmiş serum NE düzeyi aktif dönemde 0.36 (0.18-1.04) ng/ml iken inaktif dönemde 0.57 (0.33-1.32) ng/ml, düzeltilmiş serum MPO düzeyi aktif dönemde 3.13 (1.7-5.93) ng/ml iken inaktif dönemde 4.5 (3.86-5.17) ng/ml, düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyi

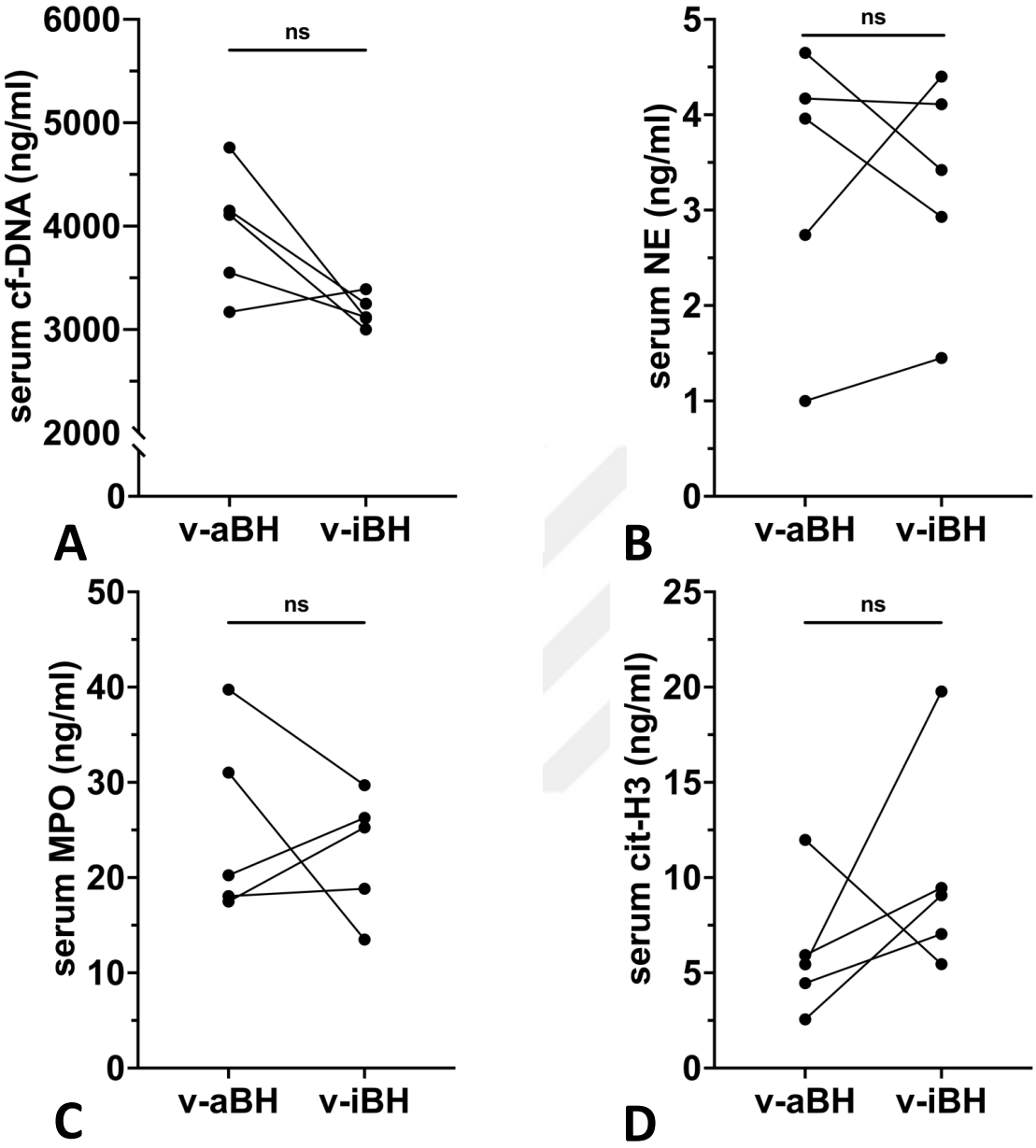
aktif dönemde 0.8 (0.38-1.35) ng/ml iken inaktif dönemde 1.82 (1.38-2.65) ng/ml olarak ölçüldü. Vasküler tutulumu olan hastalarda düzeltilmiş serum cf-DNA, NE ve MPO düzeylerinde boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken (p=0.500, p=0.686, p=0.225); düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyi boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında inaktif dönemde istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek saptandı (p=0.043) (Şekil-12).



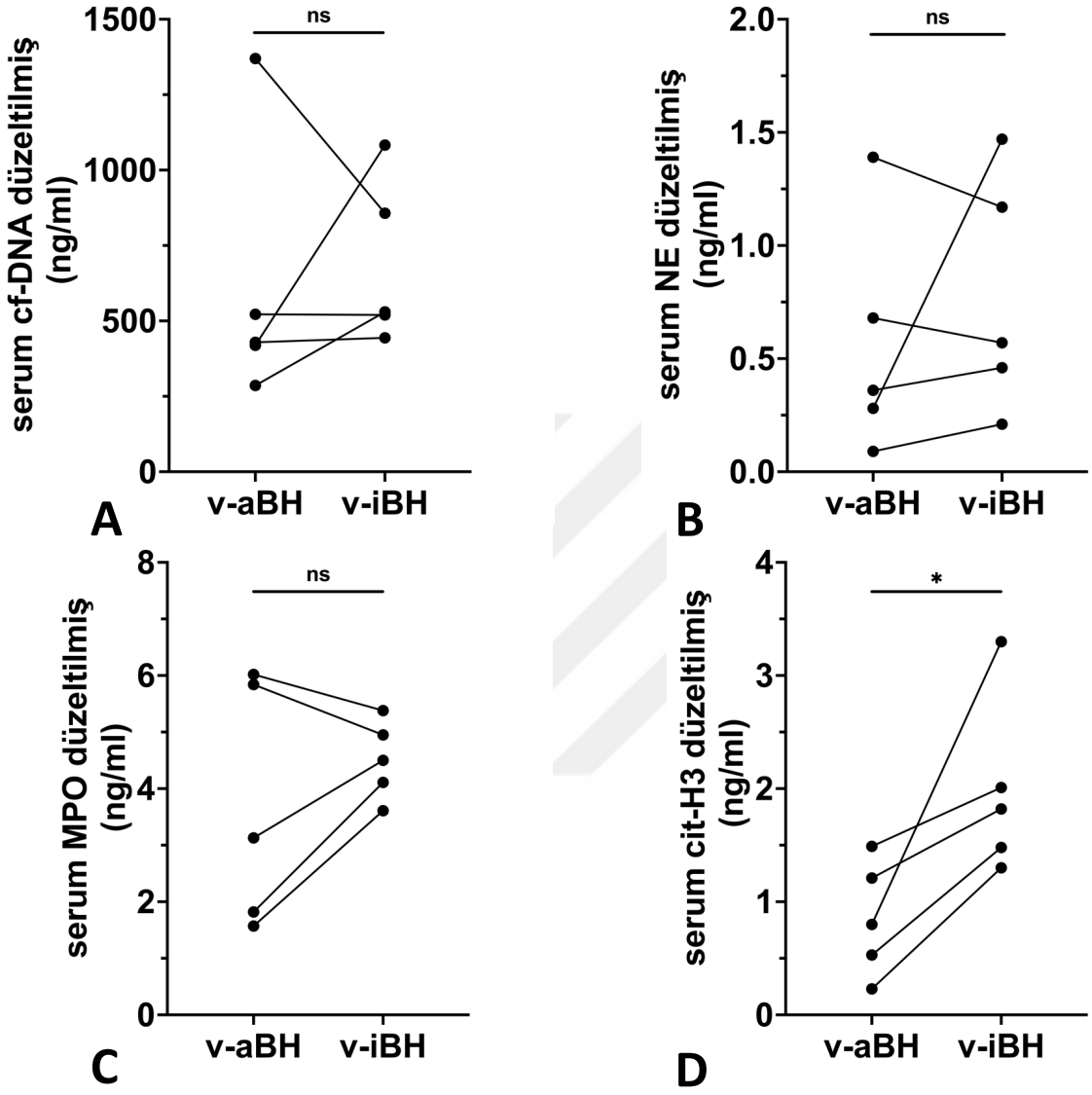
Şekil-9. Hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin serum düzeylerindeki değişimler. A. Serum cf-DNA düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **B.** Serum NE düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **C.** Serum MPO düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **D.** Serum cit-H3 boylamsal takipteki değişimi. Wilcoxon testi; **p≤0.01, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, aBH: aktif BH, iBH: inaktif BH)



Şekil-10. Hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin düzeltilmiş serum düzeylerindeki değişimler. A. Düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **B.** Düzeltilmiş serum NE düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **C.** Düzeltilmiş serum MPO düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **D.** Düzeltilmiş serum cit-H3 boylamsal takipteki değişimi. Wilcoxon testi; ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, aBH: aktif BH, iBH: inaktif BH)



Şekil-11. Vasküler tutulumu olan hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin serum düzeylerindeki değişimler. A. Serum cf-DNA düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **B.** Serum NE düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **C.** Serum MPO düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **D.** Serum cit-H3 boylamsal takipteki değişimi. Wilcoxon testi; ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, v-aBH: vasküler aktif BH, v-iBH: vasküler inaktif BH)



Şekil-12. Vasküler tutulumu olan hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin düzeltilmiş serum düzeylerindeki değişimler. **A.** Düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **B.** Düzeltilmiş serum NE düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **C.** Düzeltilmiş serum MPO düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **D.** Düzeltilmiş serum cit-H3 boylamsal takipteki değişimi. Wilcoxon testi; $p < 0.05$, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, v-aBH: vasküler aktif BH, v-iBH: vasküler inaktif BH)

D. Tükürük NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması

1. Kontrol ile Hasta Gruplarının Tükürük cf-DNA Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tükürük cf-DNA düzeyi kontrol grubunda (n=9) 226 (185-818) ng/ml, total oral aktif grupta (n=15) 462 (288-1240) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 290 (176-525) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral aktif grup ve izole oral aktif grubun tükürük cf-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.257, p=0.810) (Şekil-13A).

Düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyi kontrol grubunda (n=9) 90 (49-148) ng/ml, total oral aktif grupta (n=15) 113 (39-163) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 64 (31-130) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral aktif grup ve izole oral aktif grubun düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.594, p=0.501) (Şekil-13B).

Tükürük cf-DNA düzeyi kontrol grubunda (n=9) 226 (185-818) ng/ml, total oral inaktif grupta (n=7) 222 (122-581) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 144 (133-419) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun tükürük cf-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.427, p=0.405) (Şekil-13C).

Düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyi kontrol grubunda (n=9) 90 (49-148) ng/ml, total oral inaktif grupta (n=7) 65 (24-91) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 28.37 (26.1-59.9) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun tükürük cf-DNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.427, p=0.309) (Şekil-13D).

2. Kontrol ile Hasta Gruplarının Tükürük NE Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tükürük NE düzeyi kontrol grubunda (n=8) 2.98 (1.25-5.56) ng/ml, total oral aktif grupta (n=10) 4.34 (0.88-6.63) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=7) 4.86 (0.54-6.64) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral aktif grup ve izole oral aktif grubun tükürük NE düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.594, p=0.563) (Şekil-14A).

Düzeltilmiş tükürük NE düzeyi kontrol grubunda (n=8) 0.80 (0.33-1.86) ng/ml, total oral aktif grupta (n=10) 0.71 (0.12-1.16) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=7) 0.92 (0.11-1.58) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral aktif grup ve izole oral aktif grubun düzeltilmiş tükürük NE düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.594, p=0.817) (Şekil-14B).

Tükürük NE düzeyi kontrol grubunda (n=8) 2.98 (1.25-5.55) ng/ml, total oral inaktif grupta (n=3) 3.5 (2.05-5.46) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=1) 7.42 ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun tükürük NE düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.838, p=0.245) (Şekil-14C).

Düzeltilmiş tükürük NE düzeyi kontrol grubunda (n=8) 0.80 (0.33-1.86) ng/ml, total oral inaktif grupta (n=3) 0.98 (0.58-1.00) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=1) 0.98 ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun düzeltilmiş tükürük NE düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.838, p=0.699) (Şekil-14D).

3. Kontrol ile Hasta Gruplarının Tükürük MPO Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tükürük MPO düzeyi kontrol grubunda (n=9) 38.03 (33.75-40.35) ng/ml, total oral aktif grupta (n=15) 37.6 (36.39-38.60) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 37.5 ± 1.15 ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral aktif grup ve izole oral aktif grubun tükürük MPO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.743, p=0.847) (Şekil-15A).

Düzeltilmiş tükürük MPO düzeyi kontrol grubunda (n=9) 8.68 (7.56-11.17) ng/ml, total oral aktif grupta (n=15) 6.34 (5.37-7.68) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 7.43 (6.23-9.87) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral aktif grubun düzeltilmiş tükürük MPO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubu lehine anlamlı farklılık saptanırken (p=0.009); izole oral aktif grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0. 0.248) (Şekil-15B).

Tükürük MPO düzeyi kontrol grubunda (n=9) 38.03 (33.75-40.35) ng/ml, total oral inaktif grupta (n=7) 36.94 (33.65-37.61) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 36.21 (34.93-36.67) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun tükürük MPO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.427, p=0. 0.518) (Şekil-15C).

Düzeltilmiş tükürük MPO düzeyi kontrol grubunda (n=9) 8.68 (7.56-11.17) ng/ml, total oral inaktif grupta (n=7) 8.42 (4.88-11.06) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 5.61 (5.25-7.01) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun düzeltilmiş tükürük MPO düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.315, p=0.052) (Şekil-15D).

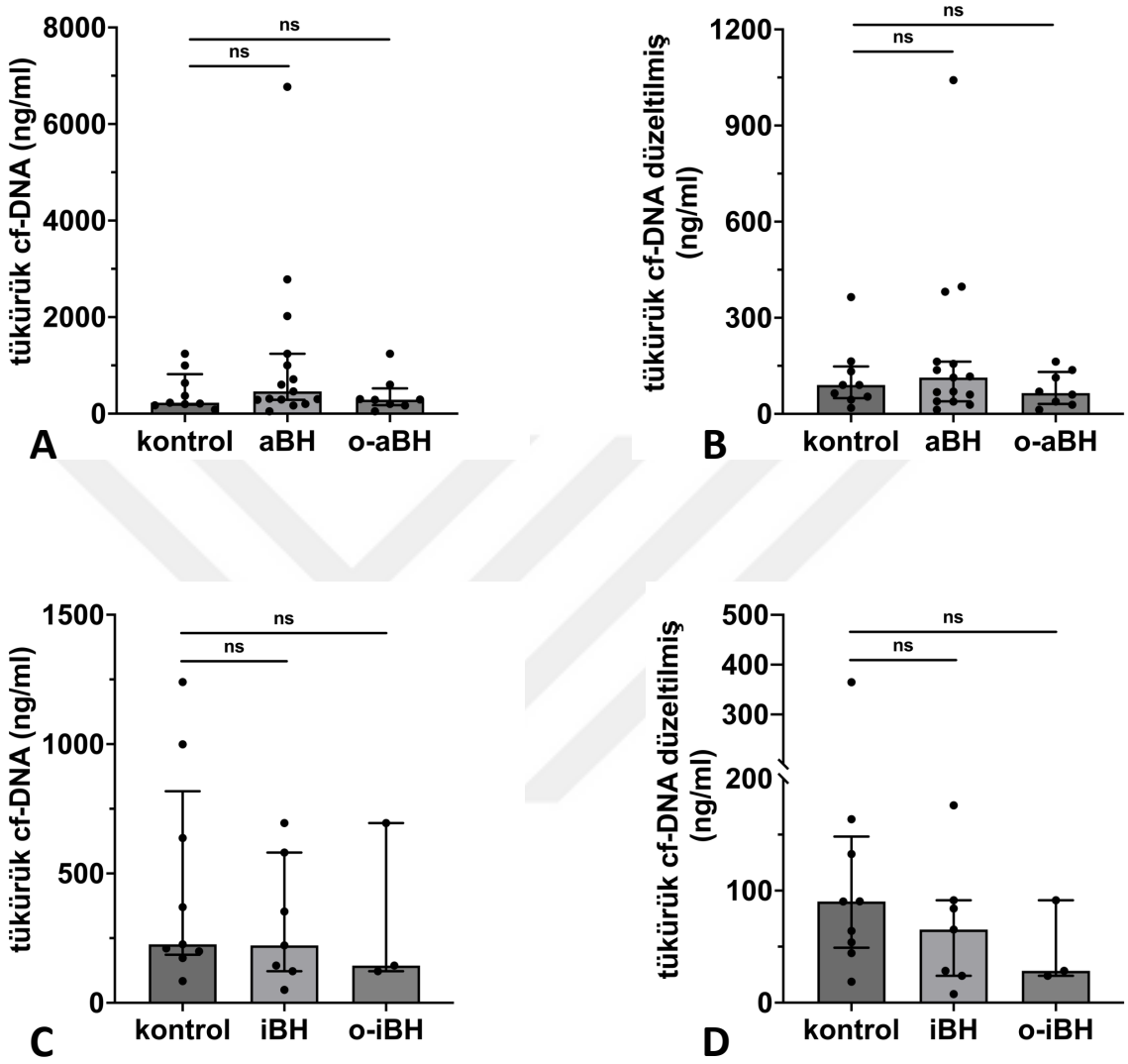
4. Kontrol ile Hasta Gruplarının Tükürük cit-H3 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tükürük cit-H3 düzeyi kontrol grubunda (n=9) 53.17 (16.49-58.09) ng/ml, total oral aktif grupta (n=15) 49.64 (17.34-54.86) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 49.37 (24.05-55.26) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral aktif grup ve izole oral aktif grubun tükürük cit-H3 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.976, p=0.923) (Şekil-16A).

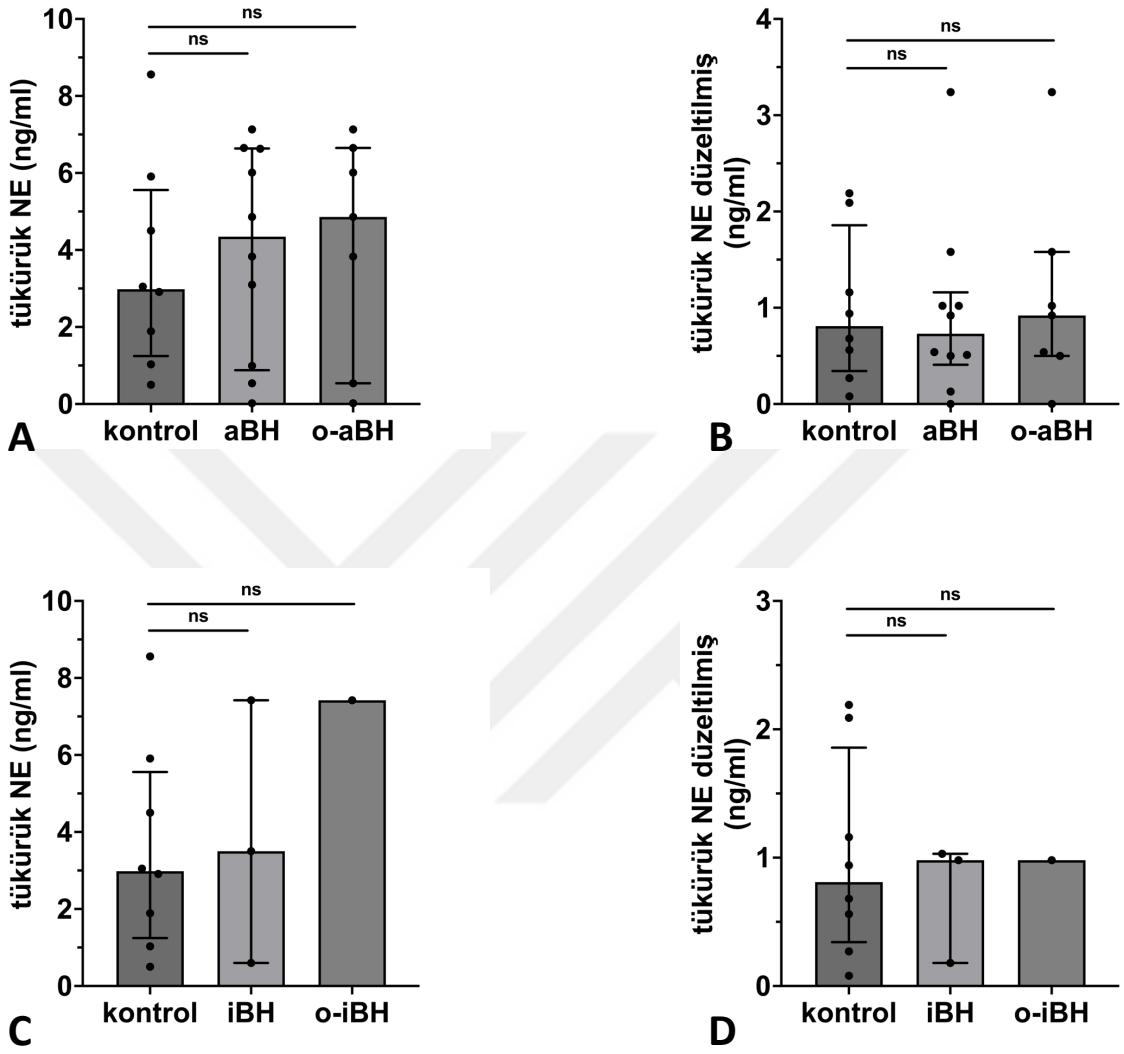
Düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyi kontrol grubunda (n=9) 10.00 (4.55-12.47) ng/ml, total oral aktif grupta (n=15) 8.45 (5.64-10.34) ng/ml ve izole oral aktif grupta (n=8) 9.89 (7.61-12.97) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral aktif grup ve izole oral aktif grubun düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.655, p=0.773) (Şekil-16B).

Tükürük cit-H3 düzeyi kontrol grubunda (n=9) 53.17 (16.49-58.09) ng/ml, total oral inaktif grupta (n=7) 53.49 (15.68-60.87) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 53.49 (50.51-57.88) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun tükürük cit-H3 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.791, p=0.309) (Şekil-16C).

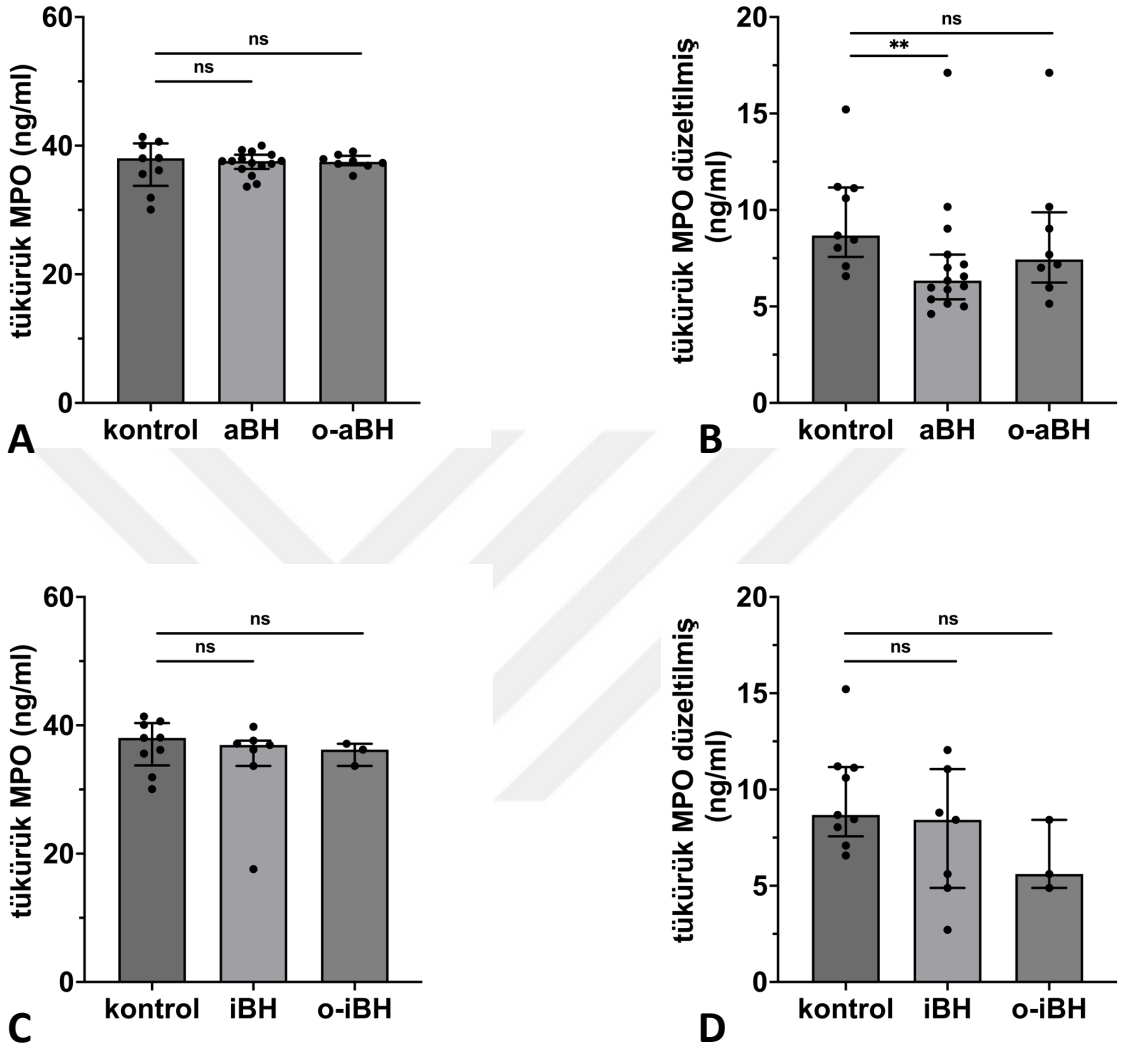
Düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyi kontrol grubunda (n=9) 10 (4.55-12.47) ng/ml, total oral inaktif grupta (n=7) 8.19 (3.73-16.39) ng/ml ve izole oral inaktif grupta (n=3) 8.19 (8.05-10.31) ng/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile total oral inaktif grup ve izole oral inaktif grubun düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0.958, p=0.782) (Şekil-16D).



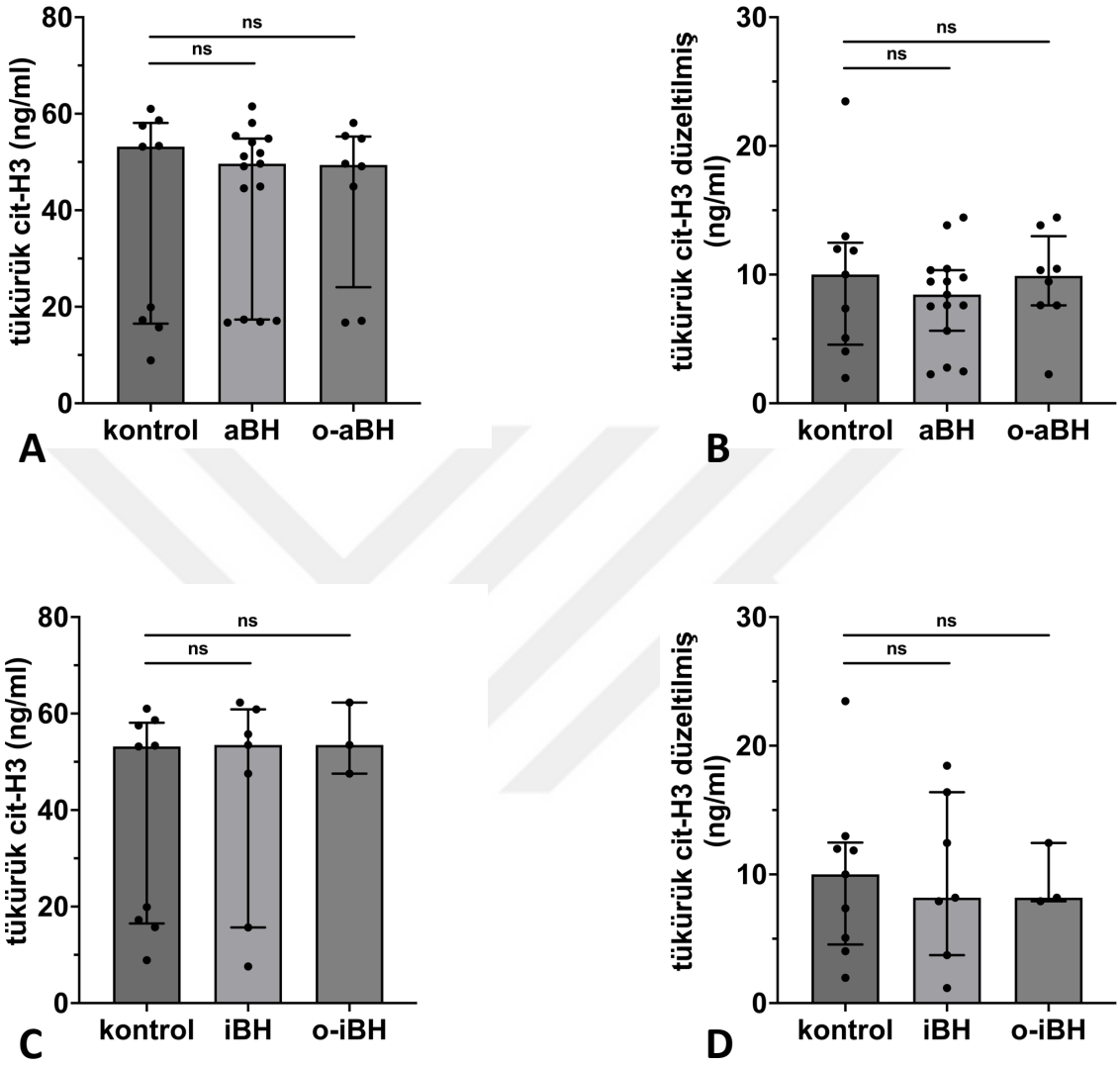
Şekil-13. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında tükürük cf-DNA ve düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyleri. A. Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında tükürük cf-DNA düzeyleri. **B.** Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyleri. **C.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında tükürük cf-DNA düzeyleri. **D.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, aBH: oral aktif BH, o-aBH: izole oral aktif BH, iBH: oral inaktif BH, o-iBH: izole oral inaktif BH)



Şekil-14. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında tükürük NE ve düzeltilmiş tükürük NE düzeyleri. A. Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında tükürük NE düzeyleri. **B.** Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında düzeltilmiş tükürük NE düzeyleri. **C.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında tükürük NE düzeyleri. **D.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş tükürük NE düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, NE: nötrofil elastaz, aBH: oral aktif BH, o-aBH: izole oral aktif BH, iBH: oral inaktif BH, o-iBH: izole oral inaktif BH)



Şekil-15. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında tükürük MPO ve düzeltilmiş tükürük MPO düzeyleri. A. Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında tükürük MPO düzeyleri. **B.** Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında düzeltilmiş tükürük MPO düzeyleri. **C.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında tükürük MPO düzeyleri. **D.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş tükürük MPO düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; **p≤0.01, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, MPO: myeloperoksidaz, aBH: oral aktif BH, o-aBH: izole oral aktif BH, iBH: oral inaktif BH, o-iBH: izole oral inaktif BH)

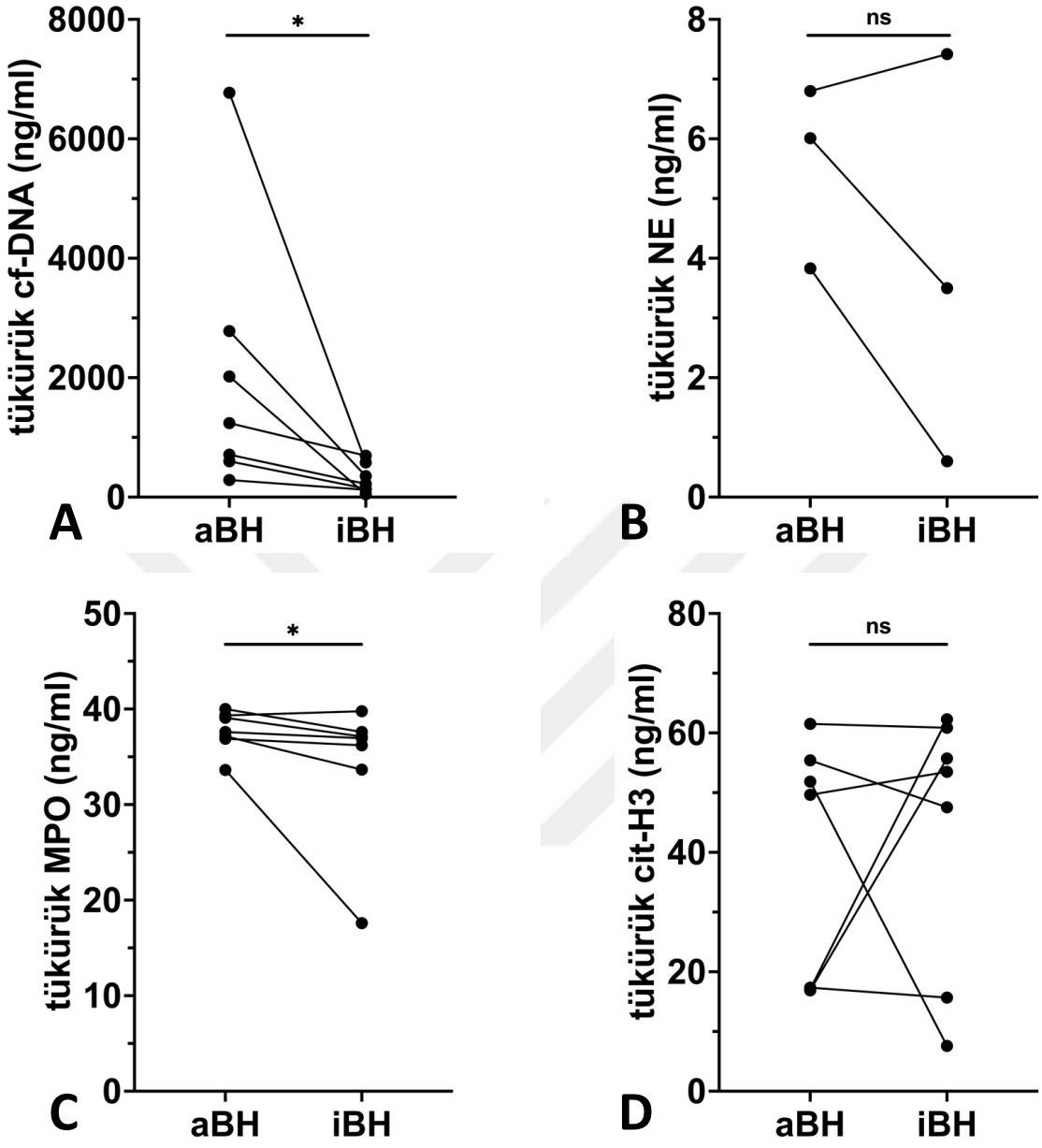


Şekil-16. Kontrol grubu, aktif ve inaktif hasta gruplarında tükürük cit-H3 ve düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyleri. A. Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında tükürük cit-H3 düzeyleri. **B.** Kontrol grubu ve aktif BH gruplarında düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyleri. **C.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında tükürük cit-H3 düzeyleri. **D.** Kontrol grubu ve inaktif BH gruplarında düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyleri. Veriler ortanca (ÇAA) olarak gösterildi. Mann-Whitney-U testi; ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cit-H3: sitrulinlenmiş histon3 aBH: oral aktif BH, o-aBH: izole oral aktif BH, iBH: oral inaktif BH, o-iBH: izole oral inaktif BH)

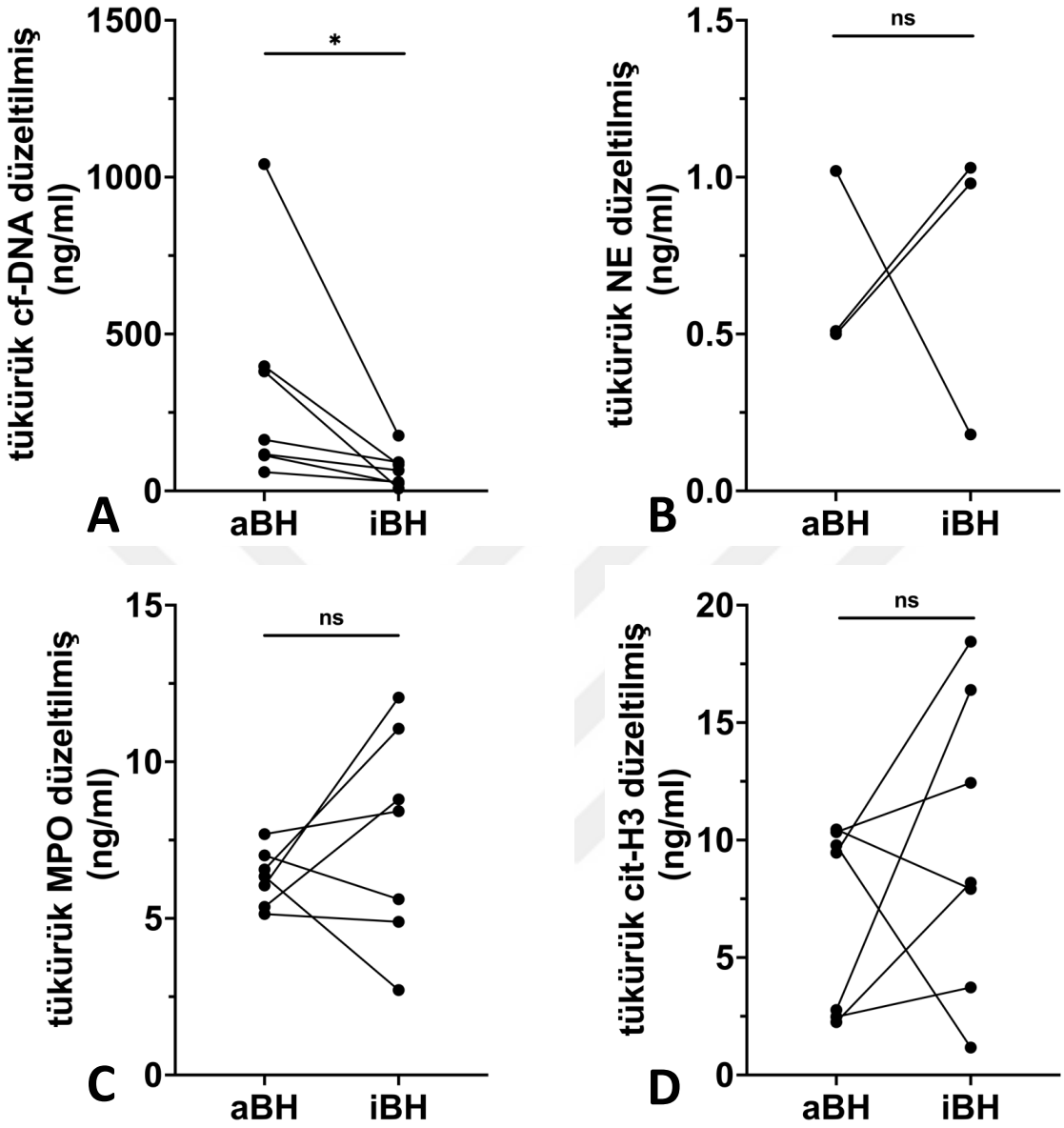
E. Boylamsal Takip Tükürük NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Karşılaştırılması

Tükürük cf-DNA düzeyi (n=7) aktif dönemde 1240 (600-2780) ng/ml iken inaktif dönemde 222 (122-581) ng/ml olarak ölçüldü. Tükürük NE düzeyi (n=3) aktif dönemde 3.82 (3.46-5.23) ng/ml iken inaktif dönemde 3.05 (2.05-5.46) ng/ml olarak ölçüldü. Tükürük MPO düzeyi aktif dönemde 37.60 (36.88-39.33) ng/ml iken inaktif dönemde 36.94 (33.65-37.61) ng/ml olarak ölçüldü. Tükürük cit-H3 düzeyi (n=7) aktif dönemde 49.64 (17.09-55.40) ng/ml iken inaktif dönemde 53.49 (15.68-60.88) ng/ml olarak ölçüldü. Tükürük cf-DNA ve MPO düzeylerinde boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanırken (p=0.018, p=0.028); NE ve cit-H3 düzeylerinde boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=1.000, p=0.866) (Şekil-17).

Düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyi (n=7) aktif dönemde 163 (113-397) ng/ml iken inaktif dönemde 65 (24-91) ng/ml olarak ölçüldü. Düzeltilmiş tükürük NE düzeyi (n=3) aktif dönemde 0.51 (0.50-0.76) ng/ml iken inaktif dönemde 0.98 (0.58-1.00) ng/ml olarak ölçüldü. Düzeltilmiş tükürük MPO düzeyi aktif dönemde 6.34 (5.37-7.01) ng/ml iken inaktif dönemde 8.42 (4.88-11.06) ng/ml olarak ölçüldü. Düzeltilmiş tükürük cit-H3 düzeyi (n=7) aktif dönemde 9.46 (2.48-10.34) ng/ml iken inaktif dönemde 8.19 (3.73-16.39) ng/ml olarak ölçüldü. Düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyinde boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanırken (p=0.018); NE, MPO ve cit-H3 düzeylerinde boylamsal takipte aktif dönem, inaktif dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=1.000, p=0.398, p=0.310) (Şekil-18).



Şekil-17. Hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin tükürük düzeylerindeki değişimler. A. Tükürük cf-DNA düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **B.** Tükürük NE düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **C.** Tükürük MPO düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **D.** Tükürük cit-H3 boylamsal takipteki değişimi. Wilcoxon testi; *$p<0.05$, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, aBH: aktif BH, iBH: inaktif BH)



Şekil-18. Hastaların boylamsal takipte aktif ve inaktif dönemlerindeki NETosis biyobelirteçlerinin düzeltilmiş tükürük düzeylerindeki değişimler. A. Düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **B.** Düzeltilmiş tükürük NE düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **C.** Düzeltilmiş tükürük MPO düzeyinin boylamsal takipteki değişimi. **D.** Düzeltilmiş tükürük cit-H3 boylamsal takipteki değişimi. Wilcoxon testi; *p <0.05, ns: anlamlı değil. (BH: Behçet hastalığı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, aBH: aktif BH, iBH: inaktif BH)

F. Serum NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Korelasyon Analizleri

1. Serum NETosis Biyobelirteçleri ile Laboratuar Parametreleri Arasındaki Korelasyon

Kontrol grubunda (n=10) serum NETosis belirteçleri ile nötrofil sayısı, CRP ve ESH değerleri arasındaki korelasyonda, nötrofil sayısı ile serum NETosis belirteçleri arasında korelasyon saptanmadı. CRP düzeyleri ile serum NE ile yüksek düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptanırken (r=0.794 p=0.006); diğer belirteçler arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. Hasta grubunda (aktif ve inaktif dönemde örnek alınan hastaların tamamı, n=48) serum NETosis belirteçleri ile nötrofil sayısı, CRP ve ESH değerleri arasında yapılan korelasyonda, nötrofil sayısı ile serum cf-DNA ve serum MPO değerleri arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptanırken (r=0.300 p=0.039, r=0.313 p=0.030); diğer belirteçler arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. CRP düzeyleri ile serum cf-DNA arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon (r=0.558 p<0.001), düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 ile arasında ise orta düzeyde istatistiksel anlamlı negatif korelasyon saptanırken (r=-0.380 p=0.008, r=-0.344 p=0.017); diğer belirteçler ile arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. ESH düzeyleri ile serum cf-DNA arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon (r=0.343 p=0.017), düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 ile arasında ise orta düzeyde istatistiksel anlamlı negatif korelasyon saptanırken (r=-0.307 p=0.034, r=-0.314 p=0.030); diğer belirteçler ile arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. Tüm örnekler grubunda (kontrol ile hasta grubu birlikte, n=58) serum NETosis belirteçleri ile nötrofil sayısı, CRP ve ESH değerleri arasındaki korelasyonda, nötrofil sayısı ile serum cfDNA arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptanırken (r=0.367 p=0.005); diğer belirteçler arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. CRP düzeyleri ile serum cf-DNA arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon (r=0.632 p<0.001), serum cit-H3, serum düzeltilmiş MPO ve serum düzeltimiş cit-H3 ile arasında ise orta düzeyde istatistiksel anlamlı negatif korelasyon saptanırken (r=-0.270 p=0.040, r=-0.515 p<0.001, r=-0.435 p=0.001); diğer belirteçler arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. ESH düzeyleri ile serum cf-DNA arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon (r=0.398 p=0.002), serum cit-H3 ile arasında düşük düzeyde istatistiksel anlamlı negatif korelasyon (r=-0.288 p=0.028), düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 ile arasında ise orta düzeyde istatistiksel anlamlı negatif korelasyon saptanırken (r=-0.365 p=0.005, r=-0.390 p=0.002); diğer belirteçler ile arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı (Tablo-5).

	Kontrol (n=10)		Hastalar (n=48)		Total (n=58)	
	r	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
Nötrofil sayısı						
cfDNA	-0.079	0.828	**0.300**	**0.039**	**0.367**	**0.005**
NE	0.238	0.508	-0.196	0.183	-0.051	0.704
MPO	0.470	0.171	**0.313**	**0.030**	0.212	0.110
cit-H3	0.402	0.249	0.051	0.732	-0.026	0.845
CRP						
cfDNA	0.127	0.726	**0.558**	**<0.001**	**0.632**	**<0.001**
NE	**0.794**	**0.006**	-0.042	0.778	0.150	0.261
MPO	0.479	0.162	-0.164	0.265	-0.227	0.087
cit-H3	0.115	0.751	-0.206	0.161	**-0.270**	**0.040**
düz. cfDNA	-0.103	0.777	-0.036	0.808	-0.128	0.340
düz. NE	0.600	0.067	-0.218	0.137	-0.094	0.481
düz. MPO	0.261	0.467	**-0.380**	**0.008**	**-0.515**	**<0.001**
düz. cit-H3	0.079	0.829	**-0.344**	**0.017**	**-0.435**	**0.001**
ESH						
cfDNA	-0.216	0.548	**0.343**	**0.017**	**0.398**	**0.002**
NE	-0.157	0.666	-0.042	0.773	0.066	0.620
MPO	0.544	0.104	-0.189	0.198	-0.194	0.145
cit-H3	-0.470	0.171	-0.220	0.133	**-0.288**	**0.028**
düz. cfDNA	0.172	0.636	0.007	0.962	-0.061	0.649
düz. NE	0.037	0.919	-0.186	0.207	-0.105	0.435
düz. MPO	0.589	0.073	**-0.307**	**0.034**	**-0.365**	**0.005**
düz. cit-H3	-0.172	0.636	**-0.314**	**0.030**	**-0.390**	**0.002**

Tablo-5. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda serum NETosis biyobelirteçleri ile laboratuar parametreleri arasındaki korelasyon. Spearman korelasyon testi. (CRP: c-reaktif protein, ESH: eritrosit sedimantasyon hızı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, düz: düzeltilmiş, r: korelasyon katsayısı, p: p değeri)

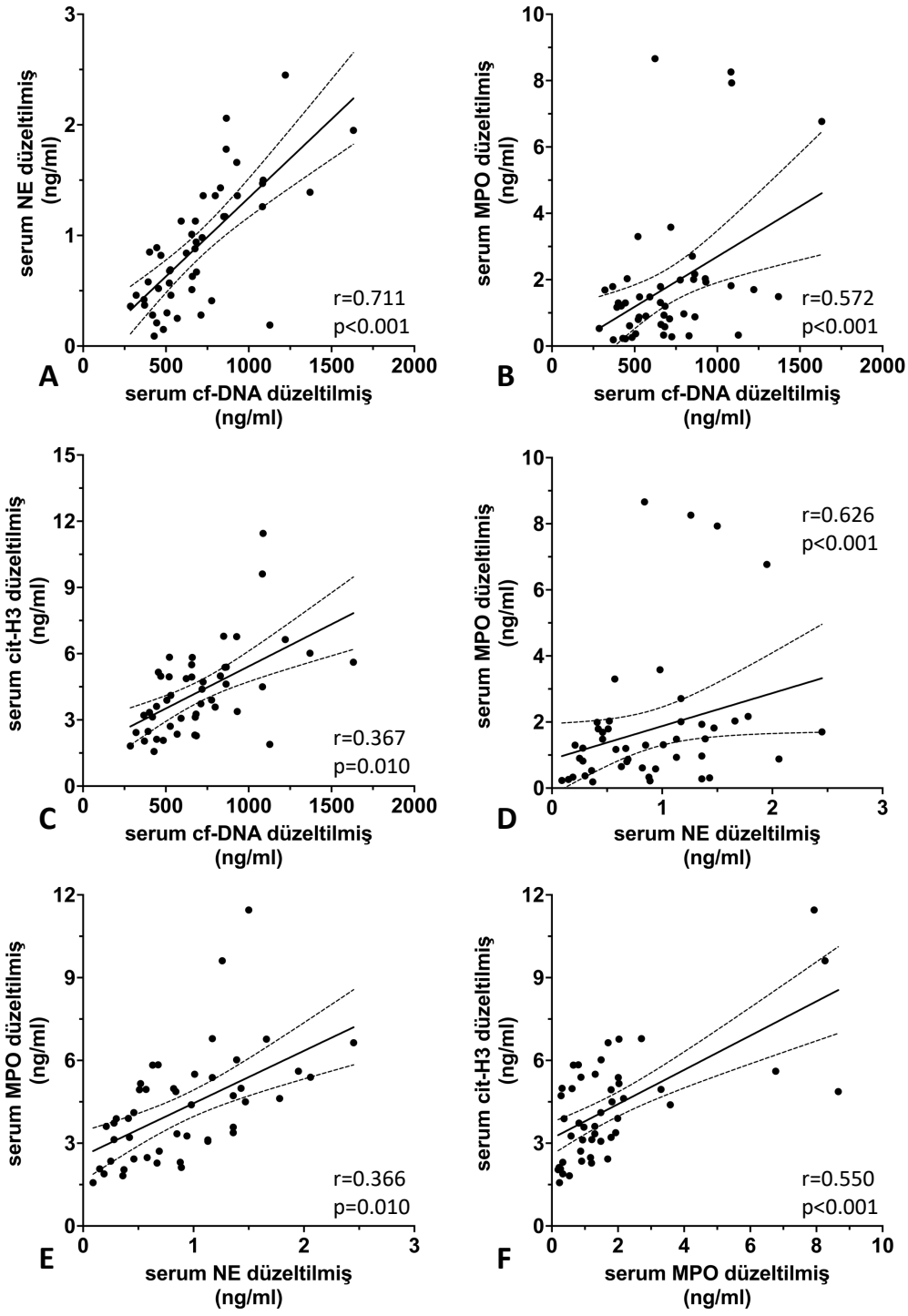
2. Serum NETosis Biyobelirteçlerinin Birbirleri Arasındaki Korelasyon

Kontrol grubunda (n=10) serum cf-DNA, NE, MPO ve cit-H3 seviyelerinin birbirleri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. Hasta grubunda (n=48) ve tüm örnekler grubunda (n=58) sadece serum MPO ve serum cit-H3 seviyeleri arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptanırken (r=0.457 p=0.001, r=0.447 p<0.001); diğer belirteçlerin birbiri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. Kontrol grubu (n=10)

ile düzeltilmiş serum cf-DNA ve düzeltilmiş serum MPO arasında yüksek düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptanırken (r=0.721 p=0.019); diğer belirteçlerin birbiri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. Hasta grubunda (n=48) düzeltilmiş serum cf-DNA ile düzeltilmiş serum NE arasında yüksek düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon (r=0.711 p=<0.001), düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 ile ise orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.572 p<0.001, r=0.367 p=0.010). Düzeltilmiş serum NE ile düzeltilmiş serum MPO ve serum cit-H3 arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.626 p<0.001, r=0.366 p=0.010). Düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 arasında da orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.550 p<0.001) (Şekil-19 ve Şekil-20). Tüm örnekler grubunda (n=58) düzeltilmiş serum cf-DNA ile düzeltilmiş serum NE, düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.636 p<0.001, r=0.594 p<0.001, r=0.399 p=0.002). Düzeltilmiş serum NE ile düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.462 p<0.001, r=0.300 p=0.022). Düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 arasında da orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.597 p<0.001) (Tablo-6) (Şekil-19).

		Kontrol (n=10)		**Hastalar (n=48)**		**Total (n=58)**	
Korelasyonlar		**r**	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
cf-DNA	**NE**	-0.042	0.907	-0.067	0.653	0.078	0.563
cf-DNA	**MPO**	0.188	0.603	0.076	0.606	-0.040	0.763
cf-DNA	**cit-H3**	0.055	0.881	0.022	0.883	-0.067	0.619
NE	**MPO**	0.188	0.603	0.003	0.985	0.455	0.553
NE	**cit-H3**	0.261	0.467	-0.021	0.889	-0.043	0.747
MPO	**cit-H3**	-0.188	0.603	**0.457**	**0.001**	**0.447**	**<0.001**
d. cf-DNA	**d. NE**	0.236	0.511	**0.711**	**<0.001**	**0.636**	**<0.001**
d. cf-DNA	**d. MPO**	**0.721**	**0.019**	**0.572**	**<0.001**	**0.594**	**<0.001**
d. cf-DNA	**d. cit-H3**	0.224	0.533	**0.367**	**0.010**	**0.399**	**0.002**
d. NE	**d. MPO**	0.455	0.187	**0.626**	**<0.001**	**0.462**	**<0.001**
d. NE	**d. cit-H3**	0.430	0.214	**0.366**	**0.010**	**0.300**	**0.022**
d. MPO	**d. cit-H3**	-0.067	0.855	**0.550**	**<0.001**	**0.597**	**<0.001**

Tablo-6. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda serum NETosis biyobelirteçlerinin birbirleri arasındaki korelasyon. Spearman korelasyon testi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, d: düzeltilmiş, r: korelasyon katsayısı, p: p değeri)



Şekil-19. Hasta grubunda düzeltilmiş serum NETosis belirteçlerinin birbiriyle korelasyonu. A. Düz. serum cf-DNA ile düz. serum NE arasındaki korelasyon. **B.** Düz. serum cf-DNA ile düz. serum MPO arasındaki korelasyon. **C.** Düz. serum cf-DNA ile düz. serum cit-H3 arasındaki korelasyon. **D.** Düz. serum NE ile düz. serum MPO arasındaki korelasyon. **E.** Düz. serum NE ile düz. serum cit-H3 arasındaki korelasyon. **F.** Düz. serum MPO ile düz. serum cit-H3 arasındaki korelasyon. Spearman korelasyon testi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, düz.: düzeltilmiş, r: korelasyon katsayısı, p: p değeri)

G. Tükürük NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Korelasyon Analizleri

1. Tükürük NETosis Biyobelirteçleri ile Laboratuar Parametreleri Arasındaki Korelasyon

Kontrol grubunda (n=9) tükürük NETosis belirteçleri ile nötrofil sayısı, CRP ve ESH değerleri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. Hasta grubunda (n=22) tükürük cf-DNA ile nötrofil sayısı ve CRP seviyeleri arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif

	Kontrol (n=9)		**Hastalar (n=22)**		**Total (n=31)**	
	r	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
Nötrofil sayısı						
cfDNA	0.184	0.635	**0.427**	**0.047**	**0.375**	**0.037**
NE¥	-0.167	0.693	0.077	0.802	-0.023	0.920
MPO	0.285	0.458	-0.224	0.317	-0.133	0.476
cit-H3	0.259	0.500	-0.167	0.458	-0.018	0.924
CRP						
cfDNA	-0.117	0.765	**0.552**	**0.008**	**0.413**	**0.021**
NE¥	0.024	0.955	0.231	0.447	0.261	0.254
MPO	0.200	0.606	0.232	0.299	0.103	0.581
cit-H3	0.050	0.898	0.061	0.787	0.042	0.824
düz. cfDNA	0.117	0.765	0.391	0.072	0.252	0.171
düz. NE¥	0.048	0.911	-0.129	0.673	-0.038	0.869
düz. MPO	-0.050	0.898	-0.312	0.158	**-0.428**	**0.016**
düz. cit-H3	-0.250	0.516	-0.209	0.350	-0.197	0.289
ESH						
cfDNA	0.495	0.175	0.203	0.364	0.202	0.275
NE¥	0.027	0.949	0.212	0.487	0.287	0.208
MPO	0.396	0.291	-0.123	0.585	-0.049	0.793
cit-H3	0.347	0.361	-0.133	0.556	-0.013	0.946
düz. cfDNA	0.584	0.099	0.032	0.889	0.046	0.806
düz. NE¥	0.109	0.797	-0.050	0.872	0.041	0.861
düz. MPO	0.455	0.218	**-0.485**	**0.022**	**-0.514**	**0.003**
düz. cit-H3	0.436	0.241	-0.353	0.107	-0.190	0.305

Tablo-7. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda tükürük NETosis biyobelirteçleri ile laboratuar parametreleri arasındaki korelasyon. Spearman korelasyon testi. (CRP: c-reaktif protein, ESH: eritrosit sedimantasyon hızı, cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, düz: düzeltilmiş, r: korelasyon katsayısı, p: p değeri, ¥: kontrol grubunda n=8, hastası grubunda n=13, total grupta n=21)

korelasyon saptanırken (r=0.427 p=0.047, r=0.552 p=0.008); tüm örnekler grubunda (n=31) tükürük cf-DNA ile nötrofil sayısı ve CRP seviyeleri arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.375 p=0.037, r=0.413 p=0.021). CRP ve ESH seviyeleri ile NETosis belirteçlerinden düzeltilmiş tükürük MPO arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı negatif korelasyon saptanırken (r=-0.428 p=0.016, r=-0.514 p=0.003); diğer belirteçlerle arasında korelasyon saptanmadı (Tablo-7).

2. Tükürük NETosis Biyobelirteçlerinin Birbirleri Arasındaki Korelasyon

Kontrol grubu (n=9), Hasta grubu (n=22) ve tüm örnekler grubunda (n=31) tükürük cf-DNA, NE, MPO ve cit-H3'ün birbirleri arasında yapılan korelasyonda, yalnızca tüm örnekler grubunda tükürük cf-DNA ile tükürük MPO arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptandı (r=0.443 p=0.015). Düzeltilmiş tükürük cf-DNA, NE, MPO ve cit-H3'ün birbiri arasında yapılan korelasyonda kontrol grubunda istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. Hasta grubunda düzeltilmiş tükürük MPO ile düzeltilmiş tükürük cit-H3 arasında orta düzeyde pozitif korelasyon saptanırken (r=0.665 p=0.001); diğer NETosis belirteçleri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı (Şekil-20). Tüm örnekler grubunda da düzeltilmiş tükürük MPO ile düzeltilmiş tükürük cit-H3 arasındaki orta düzeyde istatistiksel

		Kontrol (n=9)		**Hastalar (n=22)**		**Total (n=31)**	
		r	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
cf-DNA	**NE¥**	-0.333	0.420	0.275	0.364	0.105	0.652
cf-DNA	**MPO**	0.533	0.139	0.378	0.082	**0.433**	**0.015**
cf-DNA	**cit-H3**	0.467	0.205	0.151	0.501	0.247	0.180
NE¥	**MPO**	-0.690	0.058	0.011	0.972	-0.299	0.188
NE¥	**cit-H3**	-0.095	0.823	0.203	0.505	0.114	0.622
MPO	**cit-H3**	0.083	0.831	0.266	0.232	0.278	0.130
d. cf-DNA	**d. NE¥**	-0.262	0.531	0.154	0.616	0.018	0.938
d. cf-DNA	**d. MPO**	0.250	0.516	0.049	0.828	0.052	0.781
d. cf-DNA	**d. cit-H3**	0.333	0.318	-0.054	0.813	0.046	0.808
d. NE¥	**d. MPO**	0.405	0.320	0.363	0.223	0.406	0.067
d. NE¥	**d. cit-H3**	0.452	0.260	0.231	0.448	0.290	0.203
d. MPO	**d. cit-H3**	0.133	0.732	**0.665**	**0.001**	**0.444**	**0.012**

Tablo-8. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda tükürük NETosis biyobelirteçlerinin birbirleri arasındaki korelasyon. Spearman korelasyon testi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, d: düzeltilmiş, r: korelasyon katsayısı, p: p değeri, ¥: kontrol grubunda n=8, hasta grubunda n=13, total grupta n=21)

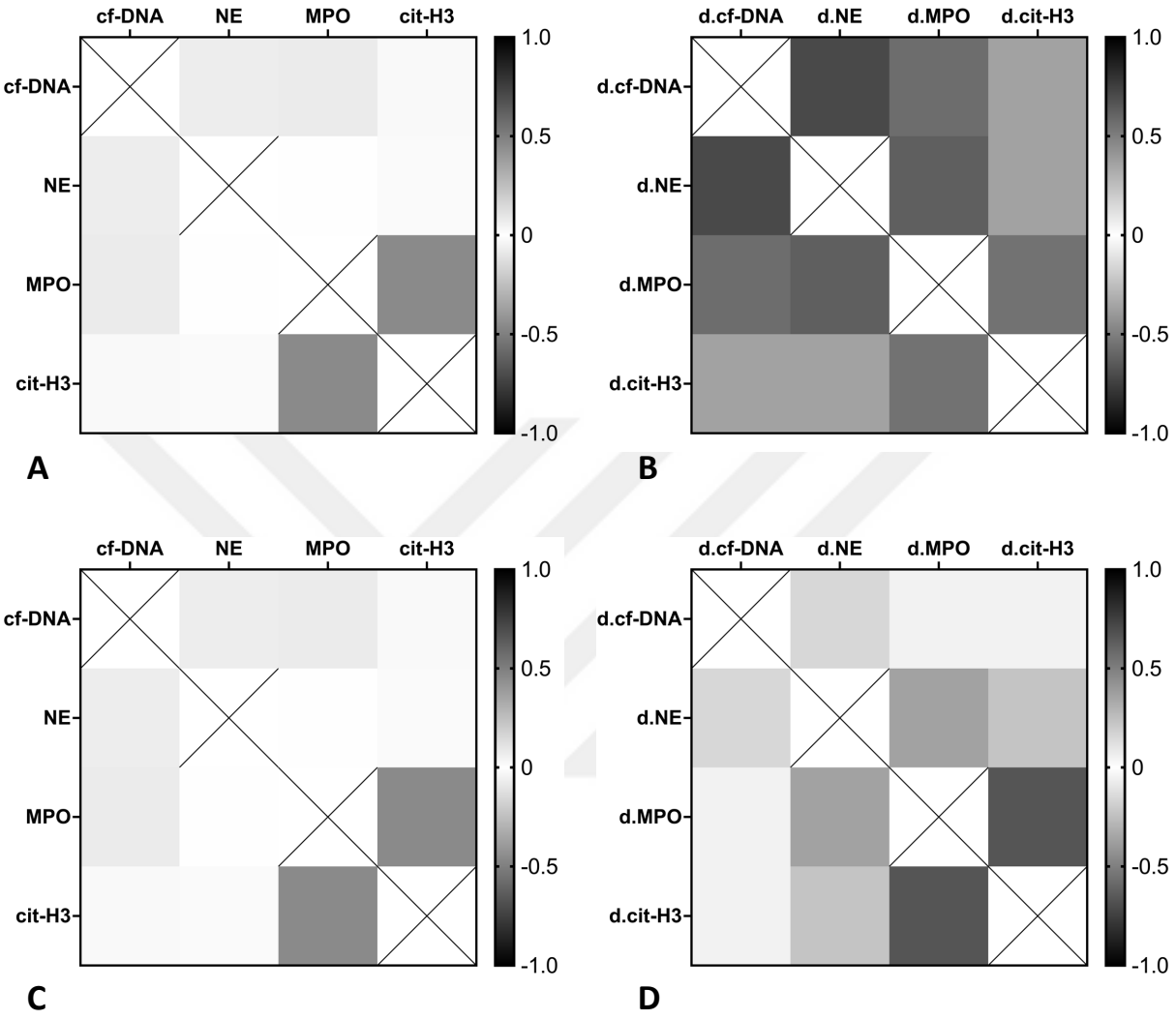
anlamlı pozitif korelasyon (r=0.444 p=0.012) dışında NETosis belirteçleri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı (Tablo-8).

H. Serum ve Tükürük NETosis Biyobelirteç Düzeylerinin Birbirleri ile Korelasyonu

NETosis biyobelirteçlerinin serum ile tükürük seviyelerinin korelasyonunda, kontrol grubunda (n=9) serum MPO ile tükürük MPO ve düzeltilmiş serum MPO ile düzeltilmiş tükürük MPO arasında kuvvetli düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptanırken (r=0.917 p=0.001, r=0.900 p= 0.001); diğer biyobelirteçlerin serum ve tükürük seviyeleri arasında korelayon saptanamdı. Hasta grubunda (n=22) düzeltilmiş serum MPO ile düzeltilmiş tükürük MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 ve düzeltilmiş tükürük cit-H3 arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı pozitif korelasyon saptanırken (r=0.468 p=0.028, r=0.434 p=0.043); diğer NETosis belirteçleri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmadı. Tüm örnekler grubunda (n=31) ise yalnızca düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş tükürük MPO arasında orta düzeyde istatistiksel anlamlı korelasyon saptandı (r=0.675 p<0.001) (Tablo-9).

		Kontrol (n=9)		**Hastalar (n=22)**		**Total (n=31)**	
Serum	**Tükürük**	**r**	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
cf-DNA	**cf-DNA**	-0.050	0.898	-0.049	0.829	-0.007	0.969
NE¥	**NE¥**	0.238	0.570	0.052	0.865	0.093	0.689
MPO	**MPO**	**0.917**	**0.001**	-0.291	0.189	0.028	0.880
cit-H3	**cit-H3**	0.350	0.356	0.308	0.164	0.308	0.092
d. cf-DNA	**cf-DNA**	-0.167	0.668	-0.347	0.114	-0.306	0.094
d. NE¥	**NE¥**	0.190	0.651	-0.027	0.929	0.055	0.814
d. MPO	**MPO**	0.067	0.865	-0.021	0.926	0.098	0.600
d. cit-H3	**cit-H3**	0.467	0.205	0.382	0.079	0.295	0.107
d. cf-DNA	**d. cf-DNA**	0.017	0.966	-0.083	0.713	-0.065	0.730
d. NE¥	**d. NE¥**	0.429	0.289	0.473	0.103	0.384	0.085
d. MPO	**d. MPO**	**0.900**	**0.001**	**0.468**	**0.028**	**0.675**	**<0.001**
d. cit-H3	**d. cit-H3**	0.333	0.381	**0.434**	**0.043**	0.350	0.054

Tablo-9. Kontrol grubu, hasta grubu ve tüm örnekler grubunda serum NETosis biyobelirteçleri ile tükürük NETosis biyobelirteçleri arasındaki korelasyon. Spearman korelasyon testi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, d: düzeltilmiş, r: korelasyon katsayısı, p: p değeri, ¥: kontrol grubunda n=8, hasta grubunda n=13, total grupta n=21)



Şekil-20. **Hasta grubunda NETosis biyobelirteçlerinin birbiri arasındaki ilişkiyi gösteren spearman rho korelasyon katsayılarının ısı haritasında gösterilmesi. A.** Serum NETosis biyobelirteçleri arasındaki korelasyon. **B.** Düzeltilmiş serum NETosis biyobelirteçleri arasındaki korelasyon. **C.** Tükürük NETosis biyobelirteçlerinin arasındaki korelasyon. **D.** Düzeltilmiş tükürük NETosis biyobelirteçleri arasındaki korelasyon. Spearman korelasyon testi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, d: düzeltilmiş)

I. ROC analizleri

Kontrol (n=10) ve hastaların (n=30) aktif dönemleri arasında anlamlı farklılık gözlenen biyobelirteçlerin hastalığı saptayan düzeyleri ROC eğrileri ile belirlendi. Aktif hasta ve kontrol grubunda serum cf-DNA ve serum NE düzeyleri ile düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3 düzeyleri değerlendirildi. Aktif ve inaktif hasta (n=18) gruplarının ayrımında ise boylamsal takipte anlamlı farklılık saptanan serum cf-DNA değerlendirildi. Ayrıca, aktif ve inaktif hasta (n=7) gruplarının ayrımında istatistiksel anlamlı fark saptanan tükürük cf-DNA, tükürük MPO ve düzeltilmiş tükürük cf-DNA'nın boylamsal takipteki değerleri incelendi.

1. Kontrol Grubunun Hasta Grubundan Ayrımı

AUC değeri serum cf-DNA için 0.947 [%95 güven aralığı (GA) 0.879-1.000, p<0.001], eşik değeri %93 duyarlılık ve %90 özgüllükle 3295 ng/ml olarak belirlendi. AUC değeri serum NE için 0.767 (%95 GA 0.619-0.914, p=0.012), eşik değeri %73 duyarlılık %70 özgüllükle 3.43 ng/ml olarak belirlendi. AUC değeri düzeltilmiş serum MPO için 0.930 (%95 GA 0.851-1.000, p<0.001), eşik değeri %87 duyarlılık ve %90 özgüllükle 5.84 ng/ml olarak belirlendi. AUC değeri düzeltilmiş serum cit-H3 için 0.797 (%95 GA 0.656-0.937, p=0.005), eşik değeri %67 duyarlılık ve %90 özgüllükle 1.34 ng/ml olarak belirlendi (Tablo-10) (Şekil-20). Bu eşik değerler aktif hasta ve kontrol grubunda ki-kare analizi ile değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı olarak farklılık saptandı (serum cf-DNA p<0.001, serum NE p=0.024, düzeltilmiş serum MPO p<0.001 ve düzeltilmiş serum cit-H3 p=0.003).

	AUC (%95 GA)	p	Eşik Değer	Duyarlılık	Özgüllük
S. cf-DNA	0.947 (0.879-1.000)	<0.001	3295 ng/ml	%93	%90
S. NE	0.767 (0.619-0.914)	0.012	3.43 ng/ml	%73	%70
S. Düz. MPO	0.930 (0.851-1.000)	<0.001	5.84 ng/ml	%87	%90
S. Düz. cit-H3	0.797 (0.656-0.937)	0.005	1.34 ng/ml	%67	%90

Tablo-10. Kontrol grubunun hasta grubundan ayrımında NETosis biyobelirteçlerinin eşik değerleri. ROC analizi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, S: serum, Düz: düzeltilmiş, AUC: eğri altında kalan alan, GA: güven aralığı, p: p değeri)

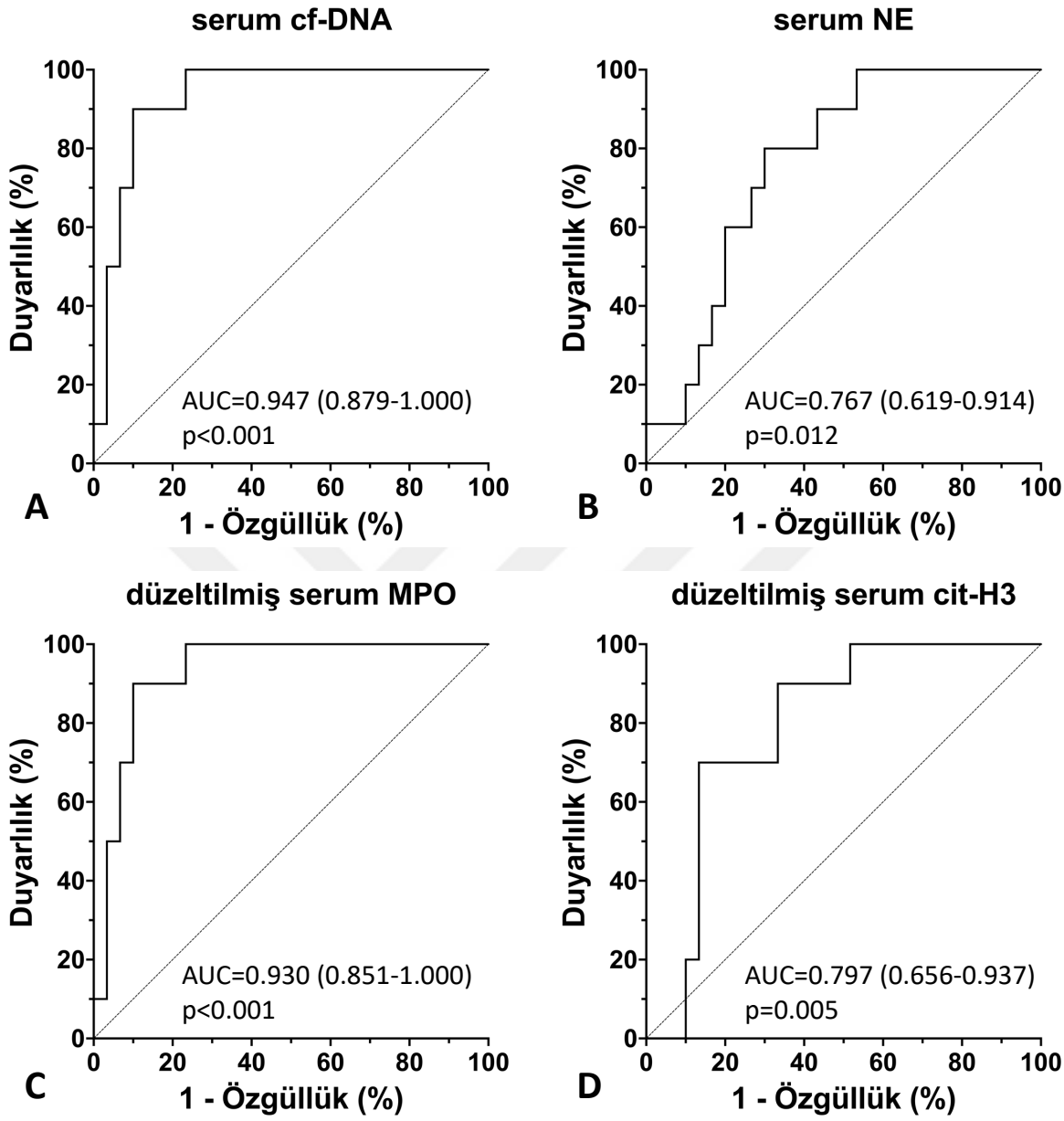
2. Aktif Hasta Grubunun İnaktif Hasta Grubundan Ayrımı

AUC değeri serum cf-DNA için 0.900 (%95 GA 0.792-1.000, p<0.001), eşik değeri %83 duyarlılık ve %89 özgüllükle 3445 ng/ml olarak belirlendi. AUC değeri tükürük cf-DNA için 0.918 (%95 GA 0.772-1.000, p=0.009), eşik değeri %86 duyarlılık ve %86 özgüllükle 590

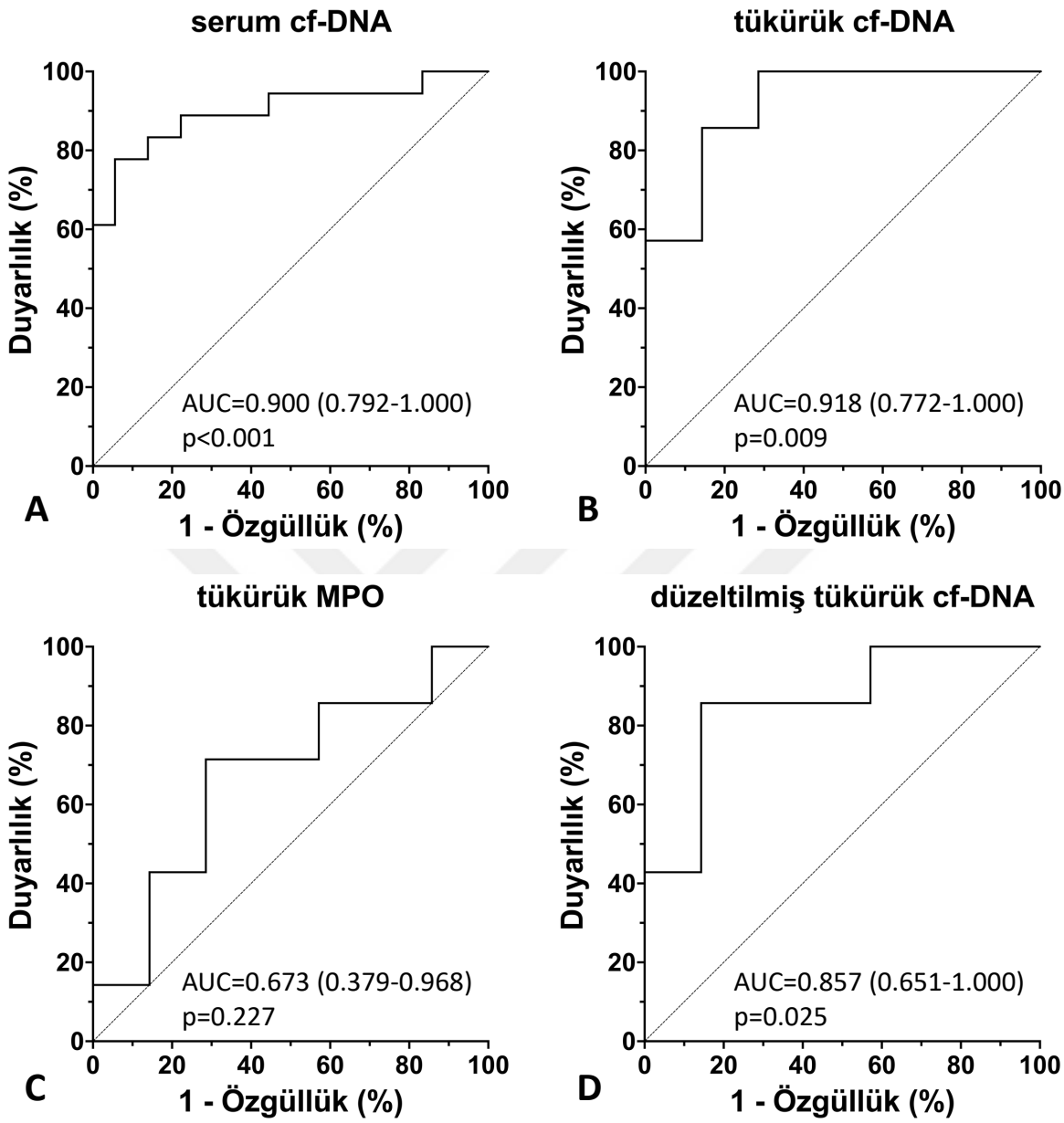
ng/ml olarak belirlendi. AUC değeri tükürük MPO için 0.673 (%95 GA 0.379-0.968, p=0.227), eşik değeri %71 duyarlılık ve %71 özgüllükle 37.14 ng/ml olarak belirlendi. AUC değeri düzeltilmiş tükürük cf-DNA için 0.857 (%95 GA 0.651-1.000, p=0.025), eşik değeri %86 duyarlılık ve %86 özgüllükle 102 ng/ml olarak belirlendi (Tablo-11) (Şekil-21). Bu eşik değerler, ki-kare analizi ile değerlendirildiğinde serum DNA ve tükürük DNA'da istatistiksel anlamlı fark saptanırken; tükürük MPO ve düzeltilmiş tükürük DNA'da istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p<0.001, p=0.029, p=0.592, p=0.102).

	AUC (%95 GA)	**p**	**Eşik Değer**	**Duyarlılık**	**Özgüllük**
S. cf-DNA	0.900 (0.792-1.000)	<0.001	3445 ng/ml	%78	%89
T. cf-DNA	0.918 (0.772-1.000)	0.009	590 ng/ml	%86	%86
T. MPO	0.673 (0.379-0.968)	0.227	37.14 ng/ml	%71	%71
Düz. T. cf-DNA	0.857 (0.651-1.000)	0.025	102 ng/ml	%86	%86

Tablo-11. Aktif hasta grubunun inaktif hasta grubundan ayrımında NETosis biyobelirteçlerinin eşik değerleri. ROC analizi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, MPO: myeloperoksidaz, S: serum, T: tükürük, Düz: düzeltilmiş, AUC: eğri altında kalan alan, GA: güven aralığı, p: p değeri)



Şekil-21. Aktif hasta grubunun kontrolden ayrımında NETosis biyobelirteçlerinin ROC eğrileri. A. Aktif hasta grubu ve kontrol ile değerlendirilen serum cf-DNA'nın ROC eğrisi. **B.** Aktif hasta grubu ve kontrol ile değerlendirilen serum NE'ın ROC eğrisi. **C.** Aktif hasta grubu ve kontrol ile değerlendirilen düzeltilmiş serum MPO'ın ROC eğrisi. **D.** Aktif hasta grubu ve kontrol ile değerlendirilen düzeltilmiş serum cit-H3'ün ROC eğrisi. ROC analizi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, NE: nötrofil elastaz, MPO: myeloperoksidaz, cit-H3: sitrulinlenmiş histon-3, AUC: eğri altında kalan alan, p: p değeri)



Şekil-22. Aktif hasta grubunun inaktif hasta grubundan ayrımında NETosis biyobelirteçlerinin ROC eğrileri. A. Aktif ve inaktif hasta grubu ile değerlendirilen serum cf-DNA'nın ROC eğrisi. **B.** Aktif ve inaktif hasta grubu ile değerlendirilen tükürük cf-DNA'nın ROC eğrisi. **C.** Aktif ve inaktif hasta grubu ile değerlendirilen tükürük MPO'nun ROC eğrisi. **D.** Aktif ve inaktif hasta grubu ile değerlendirilen düzeltilmiş tükürük cf-DNA'nın ROC eğrisi. ROC analizi. (cf-DNA: hücre-dışı serbest DNA, MPO: myeloperoksidaz, AUC: eğri altında kalan alan, p: p değeri)

VII. TARTIŞMA

BH'da nötrofil fonksiyonlarında artmanın hastalık patofizyolojisinde önemli rolünün olduğu düşünülmektedir. BH'da nötrofillerin kemotaksis, fagositik aktivite, superoksit üretimi gibi fonksiyonlarında artış görülmektedir (7). Nötrofillerin doku hasarındaki rolü özellikle vasküler tutulumda belirgindir (7, 39). BH'nda birçok patojenik mekanizma ile birlikte katkısı olan nötrofillerin NETosis yoluyla da patogenezde etkili olabileceği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (19, 128). Aktif BH'da çözünür CD40-ligand (sCD40L) uyarısı ile NET salınabileceği; fazla NET üretiminin makrofaj hiperaktivasyonuna, proinflamatuar sitokin artışına, Th1 farklılaşmasında artışı sebep olabileceği gösterilmiştir (129). Vasküler tutulumu olmayan hastalarda yapılan bir çalışmada ise, NETosis biyobelirteçlerinde artış ile birlikte kolşisin altında NETosis'in daha az olduğu gözlenmiştir (18). Literatürde bu konudaki çalışmalar sınırlıdır ve BH'da NETosis'in hastalığın gelişimindeki veya doku hasarındaki etkisinin tam olarak ortaya konulabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

BH'nın etyopatogenezini aydınlatmaya yönelik çalışmaların yanında hastalık tanısında veya takibinde kullanılabilecek özgünlüğü ve duyarlılığı yüksek biyobelirteçlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Deri paterji testi ve HLA-B*51 gibi BH için özgüllüğü sınırlı belirteçler kullanılabilir. Fakat BH'ında tanı ve takip için tanımlanmış serolojik bir biyobelirteç yoktur. Hastalık aktivitesini gösterebilecek CRP ve ESH gibi akut faz yanıtı göstergelerinin de duyarlılığı ve güvenilirliği düşüktür. BH'da patogenezdeki rolleri nedeniyle nötrofil ilişkili biyobelirteçlerin yardımcı olması beklenebilir; MPO aktivitesi, polimorfonükleer lökosit elastazı, ileri oksidasyon protein ürünleri ve tiyol gibi oksidatif stres belirteçleri, intraselüler adezyon molekül (ICAM)-1, selektin, granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF) gibi nötrofil ile ilişki belirteçlerin BH ile ilişkisi gösteren çalışmalar mevcuttur (22). Literatürde BH'nda kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesi için birçok çalışma olmasına rağmen klinik pratikte kullanılabilecek biyobelirteçler için daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç olduğu aşikardır (130-137).

BH'nın nötrofil ve NETosis ile ilişkisi göz önünde bulundurularak, biz de bu tez çalışmasında BH patogenezinde NETosis katkısını gösterebilmek için cf-DNA, MPO, NE ve cit-H3 gibi biyobelirteçleri oral ve/veya sistemik aktivasyonu olan BH'larında değerlendirdik. Belirli doku ve organlardaki bulguların ortaya çıkmasında rol oynayabilecek NETosis'in sistemik dolaşıma yansımalarını göstermek için serum örnekleri ve doku düzeyindeki NETosis etkisini gösterebilmek için de oral aktivasyonu olan hastalarda tükürük örneklerini kesitsel ve boylamsal olarak takip edilen hastalarda inceledik. Hastaların serum örneklerinde ölçülen biyobelirteç düzeylerini tüm hastaları, sistemik aktif, oral aktif ve izole oral aktif hastalar olarak

sınıflandırılarak sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırdık. Endotel aktivasyonu nedeniyle serum biyobelirteçleri üzerinde doğrudan etkisi olabilecek vasküler tutulumu olan hastaları ayrıca değerlendirdik. Oral aktivasyonu olup tükürük örnekleri değerlendirilen hastaları eşlik eden sistemik bulguların olup olmamasına göre oral aktif ve izole oral aktif olarak sınıflandırılarak sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırdık. Ayrıca, hastaların aktif ve inaktif dönemlerinde alınan örnekleri birbirleri ile karşılaştırdık. Biyobelirteçlerin laboratuar parametreleri ve birbirleriyle arasındaki korelasyonlarını inceledik. Ek olarak, NETosisle ilişkili biyobelirteçlerin mutlak nötrofil sayısından etkilenebileceğini göz önüne alarak, nötrofil sayısının yüksekliğine bağlı göreceli biyobelirteç miktarlarında artma olasılığı gibi karıştırıcı faktörleri devredışı bırakabilmek için 1 milyon nötrofil başına düşen biyobelirteç miktarlarını hesaplayarak analizler yaptık.

Serum cf-DNA düzeyleri kontrol grubu ile total aktif, sistemik aktif, oral aktif ve izole oral aktif olarak tanımlanan hasta grupları karşılaştırıldığında, hasta gruplarında serum cf-DNA düzeyleri daha yüksek saptandı. Sistemik grupta, izole oral aktif gruba göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel anlamlı değildi. Vasküler grup değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre istatistiksel anlamı olarak daha yüksek saptandı. Saptanan yüksekliğin oral, sistemik ya da vasküler aktivite durumlarında yaklaşık olarak benzer bir artış gösterdiği görüldü.

cf-DNA düzeylerinin aktif hasta gruplarında kontrol grubuna göre belirgin yüksek saptanmasına rağmen nötrofil sayısına göre düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyi sadece sistemik aktif hasta grubunda istatistiksel anlamlı olarak yüksek saptandı. İnaktif hasta grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında serum cf-DNA ve düzeltilmiş serum cf-DNA miktarları benzer saptandı. Boylamsal takipte hastaların aktif dönemden inaktif döneme geçişi sonrası serum cf-DNA miktarındaki istatistiksel anlamlı azalışın, nötrofil sayısına göre düzeltildiğinde istatistiki anlamlılığı kaybetmesi dikkati çekmekteydi.

Vasküler tutulumu olan hastalarda ististiksel olarak anlamlı olmasa bile 6 hastanın 5'inde boylamsal takipte serum cf-DNA'da belirgin azalma olduğu görülürken, düzeltilmiş serum cf-DNA'nın 2 hastada arttığı, 2 hastada azaldığı ve 2 hastada ise benzer kaldığı saptandı. Çalışılan hasta sayısının azlığı nedeniyle çelişkili sonuçları tam olarak açıklamak mümkün olmadı. Bu nedenle, daha çok sayıda ve farklı vasküler tutulum özellikleri olan hastaların incelenmesinin bulguların doğrulanması açısından gerekli olduğu düşünüldü.

Çalışmamızda aktif hastalardaki serum cf-DNA miktarı SLE, RA gibi inflamatuar hastalıklarda daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde yüksek saptandı (118). Daha önce BH'da yapılan çalışmalarda da nötrofil sayısı ile düzeltilmemiş serum cf-DNA miktarında artış

saptanmış, *in-vitro* ortamda hasta ve kontrol gruplarında PMA ile uyarılmış ve uyarılmamış $1x10^6$'şar nötrofil ile yapılan bir çalışmada BH grubunda uyarılmış ve uyarılmamış durumda cf-DNA düzeyinin yüksek olduğu görülmüştü (19, 129). Düşük dansiteli lökositlerin BH'da arttığı ve cf-DNA'nın uyarılmamış nötrofil izolatlarında sağlıklı kontrol grubu ve hasta grubu ile yapılan iki karşılaştırmanın birinde sağlıklı nötrofil izolatında diğerinde ise hastaların nötrofil izolatında yüksek olduğunu gösteren çelişkili sonuçlar bildirilmişti (115). Fakat bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde serum cf-DNA miktarı artmış gibi görünse de düzeltilmiş serum cf-DNA düzeyleri değerlendirildiğinde farklılığın anlamlılığının ortadan kalkması, BH'da belirgin sistemik aktivasyon olmadığı sürece NETosis ilişkili artan cf-DNA miktarının seruma yansımasının anlamlı düzeyde olmayacağını düşündürmektedir. Öte yandan, inflamasyonun gerçekleştiği lokal dokuda NETosis'in bir göstergesi olarak değerlendirilen tükürük cf-DNA düzeylerinin oral aktif hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olmasa da, yaklaşık 2 kat yüksek saptanması önemli bir bulguydu. Serum örneklerine benzer şekilde, kandaki nötrofil sayısına göre indirekt olarak düzeltildiğinde tükürük cf-DNA düzeylerinin hastalarda ve kontrollerde benzer düzeylerde olduğu görüldü. İnaktif dönem tükürük cf-DNA ve düzeltilmiş tükrük cf-DNA miktarında hasta ile kontrol grupları arasında belirgin fark saptanmadı. Gerileyen klinik bulgularla beraber boylamsal takip edilen hastalarının tamamında, inaktif döneme girdiklerinde hem düzeltilmiş hem de düzeltilmemiş tükürük cf-DNA miktarında anlamlı azalma olduğu saptandı.

Literatürde BH'da tükürük cf-DNA miktarıyla ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat oral liken planus gibi otoimmun bir hastalıkta tükürükte cf-DNA miktarının artabileceği gösterilmiştir (138). Düzeltilmiş cf-DNA'nın serumda hasta grubunda kontrol grubuna göre belirgin yüksek olmayıp, oral lezyonu olan hastalarda aktif dönemden inaktif döneme geçerken tükürükte azalması, NETosis'in oral aft gelişiminde katkısının olduğunu ve yeterli büyüklükte örnekte çalışıldığında farkın anlamlığa ulaşabileceğini ve cf-DNA'nın oral aktivitenin takibinde muhtemel bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür.

Serum NE düzeyleri kontrol grubu ile total aktif, sistemik aktif, oral aktif ve izole aktif olarak tanımlanan hasta grupları karşılaştırıldığında hasta gruplarında belirgin olarak daha yüksek saptandı. Sistemik aktif ve izole oral aktif grupta NE düzeyi benzer olarak saptanırken; vasküler tutulumu olan hastalarda kontrole göre yüksek ölçülmekle birlikte farkın istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı görüldü. Burada vasküler tutulumlu hasta sayısının az olmasından kaynaklanan tip 2 istatistiksel hata olabileceği düşünüldü.

Nötrofil sayısına göre düzeltildiğinde, düzeltilmiş serum NE düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da izole oral aktif grup kontrole göre 2 kata yakın yüksek saptandı, diğer

hasta gruplarının kontrol ile benzer olduğu görüldü. Düzeltilmiş serum NE izole oral aktif grup sistemik aktif gruba göre yüksek saptandı, vasküler grup ile kontrol benzer olarak ölçüldü. İnaktif hasta gruplarıyla kontroller karşılaştırıldığında, total ve sistemik inaktif hasta grubunda serum NE yüksek iken, oral ve izole oral inaktif hasta grubunda sayısal olarak fazla olmasına rağmen fark istatistiksel anlamlı değildi. Sistemik inaktif ile izole oral inaktif grup ve vasküler inaktif grup ile kontrol grubu arasında da serum NE düzeylerinde anlamlı fark saptanmadı. Düzeltilmiş serum NE inaktif gruplarda karşılaştırıldığında kontrol ve hasta grupları arasında ya da hasta gruplarının kendi içinde belirgin fark saptanmadı. Boylamsal takipte hem tüm hasta grubunda hem de vasküler grupta serum NE düzeyleri benzerken, düzeltilmiş serum NE değerlerinde sayısal fark olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Literatürde BH'da serum NE miktarının arttığı belirtilmiştir. Örneğin bir çalışmada, hastalığın akut döneminde ve remisyon döneminde sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu bulunmuştur, fakat bu çalışmada hasta grubunun ortalama nötrofil sayısının sağlıklı grubu göre belirgin yüksek olduğu dikkati çekmektedir (139). Başka bir çalışmada da vasküler tutulumu olmayan hastalarda NET ilişki elastaz miktarının aktif ve inaktif BH'da sağlıklı gruba göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (18).

Bizim çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde serum NE miktarının hasta grubunda daha yüksek olduğu görüldü. Fakat periferik kandaki nötrofil sayısına göre hesaplanan düzeltilme sonrasında, serum NE değerlerinin sağlıklı kontrol ve hasta grubunda benzer hale gelmesi serumdaki cf-DNA miktarına benzer şekilde NETosis ilişkili NE'ın hastalık aktivasyonu göstergesi olarak seruma yansıması olasılığının düşük olduğunu düşündürmektedir. Ek olarak, düzeltilmemiş serum NE düzeyleri kesitsel olarak değerlendirildiğinde aktif ve inaktif BH grubunda kontrole göre yüksek saptanıp, inaktif durumda da benzer serum NE yüksekliğinin devam etmesi dikkati çekmektedir, BH'larının hastalık aktivitesinden bağımsız olarak, düzeltilmemiş serum NE düzeylerinin kontrole göre yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızın sonuçlarını destekleyen nötrofil sayısına oranlanmış elastaz ile yapılan bir çalışmada, inflamatuar myozit, sistemik skleroz ve RA'da NE hasta gruplarında kontrole göre yüksek saptanmış, fakat düzeltilmiş NE hesaplandığında anlamlı farkın kaybolduğu görülmüştür; ayrıca hastaların aktif ve remisyon döneminde NE değerindeki anlamlı azalmanın nötrofile göre oranlanmış NE değerlerinde de görüldüğü saptanmıştır (140). Başka bir çalışmada ise, tip 1 diyabet hastalarında NETosis belirteçlerinden NE ile PR3'ün sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve NE ile PR3'ün nötrofil sayısı ile korele olduğu, nötrofil sayısına göre normalize edildiğinde sağlıklı kontrol ile hasta grubu arasındaki

farkın ortadan kalktığı saptanmıştır (141). Sonuç olarak, literatürdeki benzer çalışmalar ve kendi verilerimiz NETosis göstergelerinin serum düzeylerinin periferik kanda mutlak nötrofil sayısıyla korelasyon gösterdiğini ve bulguların doğrudan patogenezle ilişkili NETosisi yansıtmaktan ziyade, nötrofil sayısı ve belki de nötrofillerin doğal yıkım döngüsüyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Doku düzeyinde NETosis'in gösterilmesi için tükürük NE değerlendirildiğinde, tükürük NE seviyesi total aktif ve izole oral aktif grupta kontrole göre belirgin yüksek saptanmasına rağmen istatistiksel anlamlığa ulaşmadığı görüldü. Periferik kan nötrofil sayısına göre indirekt olarak yapılan düzeltme sonucunda düzeltilmiş tükürük NE kontrol grubu ile hasta gruplarında benzer ölçüldü. İnaktif hasta grupları ile kontrol arasında tükürük NE ve düzeltilmiş tükürük NE düzeylerinde sayısal farklılık olmasına rağmen örnek sayısı azlığından dolayı sağlıklı değerlendirilemedi. BH'ında ve rekürren aftöz stomatit (ROS) tanılı hastalarda yapılan bir çalışmada, bizim çalışmamız da olduğu gibi tükürük NE düzeyleri hasta gruplarında sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır (112). Ayrıca, bu çalışmada tükürükte bulunan nötrofil degranülasyonu sonucu ortaya çıkan NE'ın ülser patogenezindeki doku hasarında etkili olabileceği de belirtilmiştir (112). Başka bir çalışmada, BH'nın tükürüklerinde oral ülser olsa da olmasada NE üretiminin olduğu ve NE miktarındaki dengesizliğin sitokin ile kemokin üretimini ve epitel hasarını tetikleyebileceği belirtilmiştir (142).

Serum MPO düzeyleri kontrol grubu ile oral ve izole oral aktif grupla karşılaştırıldığında kontrol grubunda belirgin olarak yüksek saptanırken, total ve sistemik aktif hasta grupları ile kontrol benzer saptandı. Sistemik ile izole oral aktif grup arasında sistemik grup lehine ve vasküler aktif ile kontrol grubu arasında kontrol grubu lehine sayısal farklılık olmasına rağmen istatistiksel anlamlı düzeyde değildi. Serum MPO düzeyleri nötrofil sayısına göre düzeltildiğinde kontrol grubunun hasta gruplarından 2 kat kadar yüksek olduğu görüldü. İnaktif hasta grupları ile kontrol grubunun serum MPO düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubu istatistiksel anlamlı olarak total ve sistemik inaktif hasta grubuna yüksek iken; oral ve izole aktif gruba göre kontrol grubu lehine sayısal farklılık olsa da istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı görüldü. Vasküler grubun serum MPO düzeyleri inaktif durumda iken kontrol ile benzerdi. Boylamsal takipte alınan örnekler değerlendirildiğinde tüm hastalarda ve vasküler grupta düzeltilmiş serum MPO düzeylerinde inaktif dönemde istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da daha yüksek saptandı.

Literatürdeki benzer çalışmalarda, kontrol grubunun MPO aktivitesi hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş, başka bir çalışmada ise ilaç kullanımı olmayan aktif hastalarda plazma MPO düzeyi hasta grubunda belirgin yüksek saptanmıştır (143, 144). Bir

çalışmada da plazma MPO aktivitesi hasta grubunda yüksek saptanırken, nötrofil MPO aktivitesi kontrol grubu ile hasta grubunda benzer saptanmıştır (145). Başka bir çalışmada ise serum MPO düzeyleri sağlıklı grup, aktif ve inaktif hasta gruplarında benzer bulunmuştur (135). Bizim çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde, serum MPO düzeylerinin, özellikle nötrofil sayısında göre düzeltildiğinde, hastalığın aktif döneminde kontrollerden düşük olduğu görülmektedir. Literatürdeki çalışmalar birlikte bizim çalışmamızın sonuçları karşılaştırıldığında benzerlikler ve farklıklıklar dikkati çekmektedir. Doku düzeyindeki MPO düzeyinin ve NETosis etkisinin değerlendirilmesi için alınan tükürük örneklerinde kontrol grubu ve hasta grupları arasında belirgin bir farklılık saptanmamıştır. Boylamsal takipte tükürük MPO düzeylerinde hastaların çoğunda azalma olsa da, belirgin sayısal farklılık saptanmamıştır; nötrofil sayısına göre indirekt olarak düzeltildiğinde ise hastaların çoğunda bu azalmanın olmadığı dikkati çekmektedir. Ayrıca, serum ve tükürük MPO düzeyleri karşılaştırıldığında tükürük MPO düzeylerinin serumdakinden daha fazla olduğu görülmüştür. Bazı çalışmalarda oral inflamatuar durumlarda alınan örneklerde MPO miktarının arttığı belirltilmiştir (146). Kontrol grubu ile RAS'ı olan hastaların tükürüğünde MPO düzeyleri değerlendirildiğinde belirgin fark saptanmadığı bir çalışmada gösterilmiştir (147). Oral kanseri olan hastalarla kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, MPO'nun kanserli hastaların tükürüğünde daha az olduğu ve bu durumun oral kavitedeki NET oluşumu ilişki immunolojik dengenin bozulmasına bağlı olabileceği ifade edilmiştir (148). Bizim çalışmamızda ise tükürük MPO düzeylerinde ve düzeltilmiş tükürük MPO belirgin farklılık gözlenmemiştir. BH'nın oral aktivitesinde MPO'nun uygun bir belirteç olmadığı hastalık, aktivasyonu yansıtmadığı düşünülmüştür. Fakat bu değerlendirme için örnek sayısının azlığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, hem sistemik, hem de lokal olarak, doğal MPO inhibitörlerinin sonuçlara katkısı araştırılmaya değer bir konudur.

Serum cit-H3 düzeyleri kontrol grubu ve aktif hasta grupları karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da, kontrol grubunda cit-H3 düzeyinin 2 kata yakın daha yüksek olduğu saptandı. Benzer şekilde inaktif hasta grupları ile kontrol grubunun karşılatırılmasında da kontrol grubu lehine olan sayısal fark olduğu gözlendi. Ayrıca, inaktif hasta grupları ve aktif hasta grupları kesitsel olarak değerlendirildiğinde hastalığın inaktif dönemdeki hastaların ortanca cit-H3 değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü. Nötrofil sayısına göre yapılan düzeltme ile MPO düzeylerinde olduğu gibi kontrol grubu ile bazı hasta grupları arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığa ulaşacak şekilde belirgin olduğu dikkat çekmektedir. Sistemik tutulumlu hasta grubu ile izole oral tutulumlu hasta grupları arasında hem aktif hem de inaktif dönemde serum cit-H3 ve düzeltilmiş serum cit-H3 düzeylerinde

belirgin fark saptanmadı. Vasküler tutulumu olan hastalar ayrıca değerlendirildiğinde, diğer gruplarda olduğu gibi kesitsel analizde kontrol ve inaktif hasta gruplarına göre aktif hasta grubunda nötrofil sayısına ile düzeltildiğinde istatistiksel anlamlı olarak serumda cit-H3 düzeyinin daha düşük olduğu saptandı. Boylamsal takipte hem serum cit-H3 hem de düzeltilmiş cit-H3'ün hastaların aktif dönemden inaktif döneme geçişi sıransında belirgin bir sayısal artış saptandı, fakat farkın istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı görüldü. Yalnızca vasküler tutulumu olan grupta, düzeltmiş cit-H3 düzeylerinde tüm hastaların değerlerinde artış saptandığı ve farkın istatistiksel anlamlı olduğu görüldü. Bu sonuçlar göz önüne alındığında hastalığın aktif döneminde cit-H3 düzeylerinin düşük olmasıyla hem BH'larının sağlıklı gruptan ayrımında hem de aktif-inaktif hasta ayrımında kullanılabileceği düşünülmüştür.

Literatürde BH'da serum cit-H3 düzeyini gösteren çalışmalar sınırlıdır. Fakat bazı çalışmalarda BH'da doku ve hücresel düzeyde sitrulinlenmiş histonun arttığı ve sitrulinasyonu sağlayan PAD4 enziminin mRNA seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir (19, 116). BH dışında inflamatuar hastalıklar içinde örneğin juvenil idiopatik artrit hastalarında cit-H3'ün diğer NETosis belirteçleri ile birlikte sağlıklı gruba göre yüksek olduğu saptanmış (19). Başka bir çalışma da ise, cit-H3'ün endotel bariyer hasarına sebep olabileceği gösterilmiştir (149). Bu durum bizim çalışmamızla birlikte değerlendirildiğinde, özellikle aktif olan vasküler tutulumlu hastalardaki serum cit-H3 düşüklüğünün hasarlı dokuda birikerek doku düzeyinde artan aktiviteyle endotel hasarına katkı sağlayabileceği düşünülebilir.

Doku düzeyindeki cit-H3 aktivitesinin değerlendirilmesi için alınan tükürük örneklerinde kontrol grubu ve aktif-inaktif hasta grupların arasında belirgin farklılık saptanmadı. Boylamsal takipte de aktif dönemden inaktif döneme geçiş sonrası belirgin fark gözlenmedi. Tükürük cit-H3 düzeylerini serum düzeylerine göre MPO'daki gibi yüksek olduğu saptandı. Tükürük cit-H3 düzeylerinin oral hastalık aktivasyonun kontrol grubundan hastaları ayırmada, hastaların aktif ve inaktif dönemlerini birbirinden ayırmada kullanışlı bir biyobelirteç olarak kullanılamayacağı düşünüldü.

Serum ve tükürük NETosis biyobelirteçlerinin laboratuar parametreleri ve birbirleri ile ilişkisinin incelenmesi yapılan korelasyon analizleri yapıldı. Hasta grubunda inflamatuar belirteçler ile serum cf-DNA'nın pozitif yönde, düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3'ün negatif yönde ilişkili olduğu saptandı. Serum cf-DNA'nın nötrofil sayısında göre düzeltildiğinde bu ilişkinin kaybolduğu, serum MPO ve cit-H3'ün ise nötrofil sayısına göre düzeltildiğinde ilişkinin ortaya çıkması dikkat çekmektedir. Kontrol grubunda serum NETosis belirteçlerinden yalnızca serum NE ile CRP arasında ilişki saptandı. Bir çalışmada CRP seviyesi ile cf-DNA arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir (129). Lupus nefriti tanılı

hastalarda yapılan bir çalışmada ise plazma cf-DNA düzeyi ile nötrofil sayısı, CRP ve ESH arasında pozitif korelasyonsa saptanmıştır (150). RA ile alakalı bir çalışmada NETosis belirteçleri ile CRP ve ESH arasında korelasyon saptanmıştır (102). İnflamatuar bir hastalık olan BH'da hastalığında aktif dönemde yüksek saptanan serum cf-DNA ile pozitif korelasyon ve düşük saptanan düzeltilmiş serum MPO ve cit-H3'ün inflamatuar belirleteçlerle negatif korelasyon göstermesi şeklinde, NETosis biyobelirteçleri ile inflamatuar aktivite arasında bir ilişkinin varlığı dikkati çekmektedir. Tükürük NETosis belirteçlerinde ise CRP ile tükürük cf-DNA ve ESH ile nötrofil sayısına göre indirekt olarak düzeltilmiş tükürük MPO düzeyleri arasında bir ilişki saptandı. Tükürük biyobelirteçleri ile inflamatuar belirteçler arasında genel olarak belirgin ilişki saptanmadı. Buna dayanarak serumdaki inflamatuar aktive ile ağız boşluğunda tükürükteki aktivite arasında belirgin ilişki olmadığı düşünüldü. Hastalarda serum NETosis biyobelirteçlerinin birbirleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, nötrofil sayısına göre düzeltilmiş bütün biyobelirteçler arasında pozitif bir ilişki saptanması NETosis'in BH'nın patogenezi açısından dikkate değer sonuçlar ortaya çıkarabileceğini düşündürmüştür. Serum ve tükürük NETosis biyobelirteçleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde serum düzeltilmiş MPO ile kan nötrofil sayısına göre indirekt olarak düzeltilen tükürük MPO düzeyleri arasında ve serum düzeltilmiş cit-H3 ile kan nötrofil sayısına göre indirekt olarak düzeltilen tükürük cit-H3 düzeyleri arasında ilişki saptanırken diğer biyobelirteç düzeyleri arasında ilişki saptanmadı. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde serum aktivitesi ile tükürük aktivitesinin birbiri ile korele olmadığı görüldü.

BH'nı sağlıklı kontrol grubundan ayırmak ve aktif hastaları inaktif hastalardan ayrımındaki biyobelirteç düzeylerini belirlemek için serum ve tükürükteki istatistiksel anlamlı olarak fark saptanan belirteçler analiz edildi. Yapılan ROC analizlerinin sonucunda hasta gruplarını sağlıklı gruptan ayrımda serum cf-DNA, serum NE, düzeltilmiş serum MPO ve düzeltilmiş serum cit-H3'ün eşik değerleri, duyarlılık ve özgüllüğü saptandı; aktif hastaları inaktif hastalardan ayırmak için de serum cf-DNA, tükürük cf-DNA ve düzeltilmiş tükürük cf-DNA'nın eşik değerleri, duyarlıklı ve özgüllüğü saptandı. Bu biyoberliteçlerin tanısal değerlerinin yüksek olduğu belirlendi. Hastalığın tanı ve takibinde kullanılabilecek biyobelirteç adayları açısından saptanan bu değerlerin, daha yüksek sayıda ve çeşitlilikte hasta ve kontrolleri içeren çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünüldü.

Bizim çalışmamızda kontrol grubu ile serum MPO ve cit-H3 düzeylerinin özellikle aktif hastalık döneminde daha düşük olması, inaktif dönemin de boylamsal takipte istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da, sayısal olarak daha yüksek olması, bu biyobelirteçlerin BH'nın patogenezinde NETosis'in rolü hipotezi bağlamında, hastalık patogenezinde katkısının

olduğunu destekleyen veriler olarak yorumu yapılabilir. Ayrıca, bu biyobelirteçlerin serum düzeyinin düşüklüğünü açıklayıcı bir mekanizma olarak hastalığın aktif olduğu dönemde hastalığı baskılıyacı, inflamasyonu durdurucu, "karşı-düzenleyici sistem ya da kontrol sistemleri" olarak endojen inhibitörlerin var olduğu ve reaktif olarak düzeylerinin artmasına bağlı olarak MPO ve cit-H3 düzeylerinin düştüğü hipotezi ortaya atılabilir. Örneğin, bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler nitelikteki bir çalışmada MPO ilişkili olabilecek ROS ve fagositik aktivitenin azaldığı gösterilmiştir (115). SLE'de hastalık aktivasyon göstergesi olan hipokomplementemi gibi, multipl sklerozda MPO'nun serumda daha düşük saptandığını gösteren bir çalışmada olduğu gibi veya muhtemel genetik bazı polimorfizmlerin hastalık sürecinde MPO ve cit-H3 gibi biyobelirteçlerin üretimini, serum düzeyini etkileyebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (151-153). Epifenomen olarak değerlendirilen bu durumun hastalık patogenezindeki etkisini açıklamak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın öne çıkan özellikleriyle, BH'nın etyopatogenezinde NETosis ve ilişkili biyobelirteçlerin değerlendirildiği çalışmaların sınırlı sayıda olması göz önünde bulundurulduğunda, bu konudaki öncü nitelikteki çalışmalardan olduğu söylenebilir. Verilerin nötrofil sayısına göre değerlendirilmesi de çalışmanın önemli yönlerinden birisidir. Nötrofil kaynaklı biyobelirteçler olan cf-DNA, NE, MPO ve cit-H3'ün kan nötrofil sayısına göre düzeltilerek nötrofil sayısının yüksekliğine bağlı olabilecek biyobelirteçlerin nisbi olarak yüksek saptanmasının önüne geçilmiştir. Hem serum hem de doku düzeyindeki NETosis'in göstergesi olarak tükürük örneklerinin de değerlendirilmesi çalışmanın kuvvetli yönlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Boylamsal takipte alınan örneklerde NETosis biyobelirteçlerinin değerlendirilmesi, aynı hastadaki NETosis biyobelirteçleri üzerine etki edebilecek diğer faktörlerin ortadan kaldırılması ve hastalık bulgularının aktif-inaktif dönemlerindeki düzeylerin belirlenmesiyle hastalık aktivasyonunun saptanmasındaki rolü açısından değerlidir. Ayrıca, analizlerin total hasta grubuyla beraber, hastalık bulgularına göre tanımlanmış alt gruplarda inceleme yapılması da çalışmamızın bir diğer öne çıkan özelliğidir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları ise, tek merkezli bir çalışma olması, hasta sayısının azlığı, tükürük NETosis biyobelirteçlerinin direkt olarak tükürük total protein miktarı yerine indirekt olarak kan nötrofil düzeyine göre düzeltilmesidir. Bunlarla birlikte NE, MPO ve cit-H3 düzeylerinin yalnızca ELISA yöntemi ile gösterilmesi de kısıtlıklıklar arasında sayılabilir. Özellikle tükürük örneği toplanırken karıştırıcı faktörlerin etkisi, hastaların oral aft süresinin ve şiddetinin aynı olmamasının yanında gingivit, periodontit gibi oral hijyeni değiştirebilecek faktörlerle tükürükteki inflamatuar biyobelirteçlerin etkilenebilmesi çalışmamızın en önemli kısıtlıklarından biridir (154, 155).

Sonuç olarak, son zamanlarda NETosis alanında birçok çalışma yapılması rağmen BH'da çalışmalar çok sınırlıdır; NETosis'in BH patogenezindeki etkisinin gösterilmesi, NETosis ilişkili biyobelirteçlerin hastalık tanı ve takibinde kullanılabilmesi ve bu ilişki üzerinden potansiyel tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi için çok merkezli, hasta sayısının daha fazla ve homojen olduğu, serum ve tükürük dışında hastalık ilişkili tutulum alanlarının da değerlendirildiği, ELISA dışı yöntemlerin de kullanıldığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

VIII. SONUÇ

NETosis'in BH patogenezine katkısının ve NETosis ilişkili *in vitro* bulguların BH'ında kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçler olabileceğinin sağlıklı bireyler ve farklı hasta alt gruplarında incelendiği bu kesitsel ve boylamsal olarak yapılan tek merkezli çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde; serum cf-DNA ve serum NE düzeylerinin BH'da belirgin yüksek olduğu, serum cf-DNA'nın inaktif dönemde azaldığı, fakat serum NE düzeyinin benzer seyrettiği görüldü. Bu biyobelirteçlerde gözlenen farklılıklar, periferik kan nötrofil sayısına göre bir düzeltilme yapıldığında ortadan kaybolurken, düzeltilmiş serum MPO ve cit-H3 düzeylerinin ise BH'da kontrollere göre belirgin düşük kaldığı saptandı. Tükürük NETosis biyobelirteçlerinde kontrol ve hastalar arasında belirgin fark saptanmazken, tükürük ve düzeltilmiş tükürük cf-DNA düzeylerinde boylamsal takipte anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Hastalarda serum cf-DNA ile nötrofil sayısı, CRP ve ESH; düzeltilmiş serum MPO ile CRP ve ESH; düzeltilmiş serum cit-H3 ile CRP ve ESH; düzeltilmiş serum biyobelirteçlerinin birbiriyle arasında anlamlı ilişki saptandı. Tükürük cf-DNA ile nötrofil sayısı ve CRP; düzeltilmiş tükürük MPO ile ESH; düzeltilmiş tükürük MPO ile düzeltilmiş tükürük cit-H3; düzeltilmiş MPO ve düzeltilmiş cit-H3'ün serum ve tükürük düzeyleri arasında ilişki olduğu görüldü. Ayrıca, serum cf-DNA, serum NE, serum düzeltilmiş MPO ve serum düzeltilmiş cit-H3'ün hastaları sağlıklı gruptan ayırmada; serum cf-DNA, tükürük cf-DNA ve düzeltilmiş tükürük cf-DNA'nın aktif hastaların inaktif hastalardan ayrımında bir biyobelirteç adayı olarak araştırılabileceği görülmüştür. BH'ında NETosis konusunda elde ettiğimiz serum ve tükürükteki verilerin hem patogenezde NETosisin yerini destekleyen, hem de takipte yardımcı olabilecek biyobelirteç potansiyeli taşıyabilecek nitelikte olduğu görülmüş, çalışmanın tüm kısıtlılıklar göz önüne alınarak, sonuçların daha ileri çalışmalarla devam ettirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

IX. KAYNAKLAR

1. Behçet H. Uber rezidiverende, aphthose, durch ein virus verursachte gescgwure am mund, am auge und an den genitalen. Dermatol Wochenschr. 1937;105:1152–7.

2. Yusuf Yazıcı GH, Emire Seyahi, Hasan Yazıcı. Behçet Syndrome. Second ed: Springer Nature Switzerland AG 2020.

3. Yazici Y, Hatemi G, Bodaghi B, Cheon JH, Suzuki N, Ambrose N, et al. Behçet syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2021;7(1):67.

4. Cakir N, Pamuk ON, Dervis E, Imeryuz N, Uslu H, Benian O, et al. The prevalences of some rheumatic diseases in western Turkey: Havsa study. Rheumatol Int. 2012;32(4):895-908.

5. Azizlerli G, Kose AA, Sarica R, Gul A, Tutkun IT, Kulac M, et al. Prevalence of Behcet's disease in Istanbul, Turkey. Int J Dermatol. 2003;42(10):803-6.

6. Pineton de Chambrun M, Wechsler B, Geri G, Cacoub P, Saadoun D. New insights into the pathogenesis of Behcet's disease. Autoimmun Rev. 2012;11(10):687-98.

7. Tong B, Liu X, Xiao J, Su G. Immunopathogenesis of Behcet's Disease. Front Immunol. 2019;10:665.

8. Gul A, Ohno S. HLA-B*51 and Behcet Disease. Ocul Immunol Inflamm. 2012;20(1):37-43.

9. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease. Lancet. 1990;335(8697):1078-80.

10. Yazici H, Seyahi E, Hatemi G, Yazici Y. Behçet syndrome: a contemporary view. Nat Rev Rheumatol. 2018;14(2):107-19.

11. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004;303(5663):1532-5.

12. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2007;176(2):231-41.

13. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. Nat Rev Immunol. 2018;18(2):134-47.

14. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. Biochemistry (Mosc). 2020;85(10):1178-90.

15. Neubert E, Meyer D, Rocca F, Gunay G, Kwaczala-Tessmann A, Grandke J, et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. Nat Commun. 2018;9(1):3767.

16. Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. Nat Rev Nephrol. 2016;12(7):402-13.

17. Wigerblad G, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps in systemic autoimmune and autoinflammatory diseases. Nat Rev Immunol. 2022.

18. Bettiol A, Becatti M, Silvestri E, Argento FR, Fini E, Mannucci A, et al. Neutrophil-mediated mechanisms of damage and in-vitro protective effect of colchicine in non-vascular Behcet's syndrome. Clin Exp Immunol. 2021;206(3):410-21.

19. Le Joncour A, Martos R, Loyau S, Lelay N, Dossier A, Cazes A, et al. Critical role of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with Behcet's disease. Ann Rheum Dis. 2019;78(9):1274-82.

20. Mohan C, Assassi S. Biomarkers in rheumatic diseases: how can they facilitate diagnosis and assessment of disease activity? BMJ. 2015;351:h5079.

21. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001;69(3):89-95.

22. Johannes Nowatzky TC-S. Biomarkers in Behçet’s disease: diagnosis and disease activity. Int J Clin Rheumatol. 2009;4(3):271–86.

23. Ranucci R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases. Methods Mol Biol. 2019;1909:3-12.

24. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. Biochimie. 2008;90(2):227-42.

25. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. J Leukoc Biol. 2005;77(5):598-625.

26. Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. Nat Rev Immunol. 2006;6(7):541-50.

27. Xu YM, Du JY, Lau AT. Posttranslational modifications of human histone H3: an update. Proteomics. 2014;14(17-18):2047-60.

28. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. J Immunol. 2008;180(3):1895-902.

29. Davies MJ, Hawkins CL. The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule Modification, Chronic Inflammation, and Disease. Antioxid Redox Signal. 2020;32(13):957-81.

30. Behcet H, Matteson EL. On relapsing, aphthous ulcers of the mouth, eye and genitalia caused by a virus. 1937. Clin Exp Rheumatol. 2010;28(4 Suppl 60):S2-5.

31. Verity DH, Marr JE, Ohno S, Wallace GR, Stanford MR. Behcet's disease, the Silk Road and HLA-B51: historical and geographical perspectives. Tissue Antigens. 1999;54(3):213-20.

32. Ergun T, Ince U, Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H, Gurbuz O, Gurses L, et al. HSP 60 expression in mucocutaneous lesions of Behcet's disease. J Am Acad Dermatol. 2001;45(6):904-9.

33. Deniz E, Guc U, Buyukbabani N, Gul A. HSP 60 expression in recurrent oral ulcerations of Behcet's disease. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;110(2):196-200.

34. Direskeneli H. Innate and Adaptive Responses to Heat Shock Proteins in Behcet's Disease. Genet Res Int. 2013;2013:249157.

35. Hasan MS, Ryan PL, Bergmeier LA, Fortune F. Circulating NK cells and their subsets in Behcet's disease. Clin Exp Immunol. 2017;188(2):311-22.

36. Yasuoka H, Yamaguchi Y, Mizuki N, Nishida T, Kawakami Y, Kuwana M. Preferential activation of circulating CD8+ and gammadelta T cells in patients with active Behcet's disease and HLA-B51. Clin Exp Rheumatol. 2008;26(4 Suppl 50):S59-63.

37. Parlakgul G, Guney E, Erer B, Kilicaslan Z, Direskeneli H, Gul A, et al. Expression of regulatory receptors on gammadelta T cells and their cytokine production in Behcet's disease. Arthritis Res Ther. 2013;15(1):R15.

38. Becatti M, Emmi G, Silvestri E, Bruschi G, Ciucciarelli L, Squatrito D, et al. Neutrophil Activation Promotes Fibrinogen Oxidation and Thrombus Formation in Behcet Disease. Circulation. 2016;133(3):302-11.

39. Emmi G, Becatti M, Bettiol A, Hatemi G, Prisco D, Fiorillo C. Behcet's Syndrome as a Model of Thrombo-Inflammation: The Role of Neutrophils. Front Immunol. 2019;10:1085.

40. Ahn JK, Yu HG, Chung H, Park YG. Intraocular cytokine environment in active Behcet uveitis. Am J Ophthalmol. 2006;142(3):429-34.

41. Oztas MO, Onder M, Gurer MA, Bukan N, Sancak B. Serum interleukin 18 and tumour necrosis factor-alpha levels are increased in Behcet's disease. Clin Exp Dermatol. 2005;30(1):61-3.

42. Nanke Y, Yago T, Kotake S. The Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Behcet's Disease. J Clin Med. 2017;6(7).

43. Na SY, Park MJ, Park S, Lee ES. Up-regulation of Th17 and related cytokines in Behcet's disease corresponding to disease activity. Clin Exp Rheumatol. 2013;31(3 Suppl 77):32-40.

44. Hamzaoui K, Bouali E, Ghorbel I, Khanfir M, Houman H, Hamzaoui A. Expression of Th-17 and RORgammat mRNA in Behcet's Disease. Med Sci Monit. 2011;17(4):CR227-34.

45. Geri G, Terrier B, Rosenzwajg M, Wechsler B, Touzot M, Seilhean D, et al. Critical role of IL-21 in modulating TH17 and regulatory T cells in Behcet disease. J Allergy Clin Immunol. 2011;128(3):655-64.

46. Hirahara L, Takase-Minegishi K, Kirino Y, Iizuka-Iribe Y, Soejima Y, Yoshimi R, et al. The Roles of Monocytes and Macrophages in Behcet's Disease With Focus on M1 and M2 Polarization. Front Immunol. 2022;13:852297.

47. Bouali E, Kaabachi W, Hamzaoui A, Hamzaoui K. Interleukin-37 expression is decreased in Behcet's disease and is associated with inflammation. Immunol Lett. 2015;167(2):87-94.

48. Takeuchi M, Kastner DL, Remmers EF. The immunogenetics of Behcet's disease: A comprehensive review. J Autoimmun. 2015;64:137-48.

49. Gul A. Genetics of Behcet's disease: lessons learned from genomewide association studies. Curr Opin Rheumatol. 2014;26(1):56-63.

50. Tedeschi V, Paldino G, Paladini F, Mattorre B, Tuosto L, Sorrentino R, et al. The Impact of the 'Mis-Peptidome' on HLA Class I-Mediated Diseases: Contribution of ERAP1 and ERAP2 and Effects on the Immune Response. Int J Mol Sci. 2020;21(24).

51. McGonagle D, Aydin SZ, Gul A, Mahr A, Direskeneli H. 'MHC-I-opathy'-unified concept for spondyloarthritis and Behcet disease. Nat Rev Rheumatol. 2015;11(12):731-40.

52. Morton LT, Situnayake D, Wallace GR. Genetics of Behcet's disease. Curr Opin Rheumatol. 2016;28(1):39-44.

53. Oh SH, Han EC, Lee JH, Bang D. Comparison of the clinical features of recurrent aphthous stomatitis and Behcet's disease. Clin Exp Dermatol. 2009;34(6):e208-12.

54. Alpsoy E, Zouboulis CC, Ehrlich GE. Mucocutaneous lesions of Behcet's disease. Yonsei Med J. 2007;48(4):573-85.

55. Krause I, Rosen Y, Kaplan I, Milo G, Guedj D, Molad Y, et al. Recurrent aphthous stomatitis in Behcet's disease: clinical features and correlation with systemic disease expression and severity. J Oral Pathol Med. 1999;28(5):193-6.

56. Ghate JV, Jorizzo JL. Behcet's disease and complex aphthosis. J Am Acad Dermatol. 1999;40(1):1-18; quiz 9-20.

57. Chun SI, Su WP, Lee S. Histopathologic study of cutaneous lesions in Behcet's syndrome. J Dermatol. 1990;17(6):333-41.

58. Gurler A, Boyvat A, Tursen U. Clinical manifestations of Behcet's disease: an analysis of 2147 patients. Yonsei Med J. 1997;38(6):423-7.

59. Mat MC, Goksugur N, Engin B, Yurdakul S, Yazici H. The frequency of scarring after genital ulcers in Behcet's syndrome: a prospective study. Int J Dermatol. 2006;45(5):554-6.

60. Kim B, LeBoit PE. Histopathologic features of erythema nodosum--like lesions in Behcet disease: a comparison with erythema nodosum focusing on the role of vasculitis. Am J Dermatopathol. 2000;22(5):379-90.

61. Ergun T. Pathergy Phenomenon. Front Med (Lausanne). 2021;8:639404.

62. Yazici H, Tuzun Y, Tanman AB, Yurdakul S, Serdaroglu S, Pazarli H, et al. Male patients with Behcet's syndrome have stronger pathergy reactions. Clin Exp Rheumatol. 1985;3(2):137-41.

63. Deniz R, Emrence Z, Yalcinkaya Y, Esen BA, Inanc M, Ocal ML, et al. Improved Sensitivity of Skin Pathergy Test with Polysaccharide Pneumococcal Vaccine Antigens in the Diagnosis of Behcet Disease. Rheumatology (Oxford). 2022.

64. Ksiaa I, Abroug N, Kechida M, Zina S, Jelliti B, Khochtali S, et al. Eye and Behcet's disease. J Fr Ophtalmol. 2019;42(4):e133-e46.

65. Tugal-Tutkun I, Onal S, Altan-Yaycioglu R, Huseyin Altunbas H, Urgancioglu M. Uveitis in Behcet disease: an analysis of 880 patients. Am J Ophthalmol. 2004;138(3):373-80.

66. Tugal-Tutkun I. Behcet disease in the developing world. Int Ophthalmol Clin. 2010;50(2):87-98.

67. Benamour S, Zeroual B, Alaoui FZ. Joint manifestations in Behcet's disease. A review of 340 cases. Rev Rhum Engl Ed. 1998;65(5):299-307.

68. Kim HA, Choi KW, Song YW. Arthropathy in Behcet's disease. Scand J Rheumatol. 1997;26(2):125-9.

69. Fatemi A, Shahram F, Akhlaghi M, Smiley A, Nadji A, Davatchi F. Prospective study of articular manifestations in Behcet's disease: five-year report. Int J Rheum Dis. 2017;20(1):97-102.

70. Arkin CR, Rothschild BM, Florendo NT, Popoff N. Behcet syndrome with myositis. A case report with pathologic findings. Arthritis Rheum. 1980;23(5):600-4.

71. Emmi G, Bettiol A, Silvestri E, Di Scala G, Becatti M, Fiorillo C, et al. Vascular Behcet's syndrome: an update. Intern Emerg Med. 2019;14(5):645-52.

72. Fei Y, Li X, Lin S, Song X, Wu Q, Zhu Y, et al. Major vascular involvement in Behcet's disease: a retrospective study of 796 patients. Clin Rheumatol. 2013;32(6):845-52.

73. Seyahi E, Yazici H. Behcet's syndrome: pulmonary vascular disease. Curr Opin Rheumatol. 2015;27(1):18-23.

74. Demirelli S, Degirmenci H, Inci S, Arisoy A. Cardiac manifestations in Behcet's disease. Intractable Rare Dis Res. 2015;4(2):70-5.

75. Al-Araji A, Kidd DP. Neuro-Behcet's disease: epidemiology, clinical characteristics, and management. Lancet Neurol. 2009;8(2):192-204.

76. Borhani-Haghighi A, Kardeh B, Banerjee S, Yadollahikhales G, Safari A, Sahraian MA, et al. Neuro-Behcet's disease: An update on diagnosis, differential diagnoses, and treatment. Mult Scler Relat Disord. 2019;39:101906.

77. Skef W, Hamilton MJ, Arayssi T. Gastrointestinal Behcet's disease: a review. World J Gastroenterol. 2015;21(13):3801-12.

78. Hatemi I, Hatemi G, Celik AF. Gastrointestinal Involvement in Behcet Disease. Rheum Dis Clin North Am. 2018;44(1):45-64.

79. Jung YS, Cheon JH, Park SJ, Hong SP, Kim TI, Kim WH. Long-term clinical outcomes of Crohn's disease and intestinal Behcet's disease. Inflamm Bowel Dis. 2013;19(1):99-105.

80. Erkan F, Gul A, Tasali E. Pulmonary manifestations of Behcet's disease. Thorax. 2001;56(7):572-8.

81. Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Markomichelakis N, Kaklamanis P. Recurrent epididymo-orchitis in patients with Behcet's disease. J Urol. 2000;163(2):487-9.

82. Esatoglu SN, Hatemi G. Update on the treatment of Behcet's syndrome. Intern Emerg Med. 2019;14(5):661-75.

83. Karadag O, Bolek EC. Management of Behcet's syndrome. Rheumatology (Oxford). 2020;59(Suppl 3):iii108-iii17.

84. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. Physiol Rev. 2019;99(2):1223-48.

85. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. Sci STKE. 2007;2007(379):pe11.

86. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2020;36:191-218.

87. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. J Cell Biol. 2009;184(2):205-13.

88. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2010;191(3):677-91.

89. Thiam HR, Wong SL, Qiu R, Kittisopikul M, Vahabikashi A, Goldman AE, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(13):7326-37.

90. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat Med. 2007;13(4):463-9.

91. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ. 2009;16(11):1438-44.

92. Kasprzycka W, Homa-Mlak I, Mlak R, Małecka-Massalska T. Direct and indirect methods of evaluating the NETosis process. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research. 2019;13(1):50-6.

93. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Induction and Quantification of NETosis. Curr Protoc Immunol. 2016;115:14 41 1-14 41 14.

94. Gavillet M, Martinod K, Renella R, Harris C, Shapiro NI, Wagner DD, et al. Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. Am J Hematol. 2015;90(12):1155-8.

95. Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ. A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. J Immunol Methods. 2015;423:104-10.

96. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. Clin Chim Acta. 2015;450:243-53.

97. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. Sci Transl Med. 2011;3(73):73ra20.

98. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(21):9813-8.

99. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat Med. 2009;15(6):623-5.

100. Yoshida M, Sasaki M, Sugisaki K, Yamaguchi Y, Yamada M. Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis. Clin Kidney J. 2013;6(3):308-12.

101. Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2018;14(8):467-75.

102. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. Sci Transl Med. 2013;5(178):178ra40.

103. Szekanecz Z, McInnes IB, Schett G, Szamosi S, Benko S, Szucs G. Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. Nat Rev Rheumatol. 2021;17(10):585-95.

104. Jariwala MP, Laxer RM. NETosis in Rheumatic Diseases. Curr Rheumatol Rep. 2021;23(2):9.

105. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhofer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. Nat Med. 2014;20(5):511-7.

106. Paget C, Doz-Deblauwe E, Winter N, Briard B. Specific NLRP3 Inflammasome Assembling and Regulation in Neutrophils: Relevance in Inflammatory and Infectious Diseases. Cells. 2022;11(7).

107. Chen KW, Demarco B, Broz P. Beyond inflammasomes: emerging function of gasdermins during apoptosis and NETosis. EMBO J. 2020;39(2):e103397.

108. Matsumura N, Mizushima Y. Leucocyte movement and colchicine treatment in Behcet's disease. Lancet. 1975;2(7939):813.

109. Eksioglu-Demiralp E, Direskeneli H, Kibaroglu A, Yavuz S, Ergun T, Akoglu T. Neutrophil activation in Behcet's disease. Clin Exp Rheumatol. 2001;19(5 Suppl 24):S19-24.

110. Mumcu G, Cimilli H, Karacayli U, Inanc N, Ture-Ozdemir F, Eksioglu-Demiralp E, et al. Salivary levels of antimicrobial peptides Hnp 1-3, Ll-37 and S100 in Behcet's disease. Arch Oral Biol. 2012;57(6):642-6.

111. Mumcu G, Cimilli H, Karacayli U, Inanc N, Ture-Ozdemir F, Eksioglu-Demiralp E, et al. Salivary levels of HNP 1-3 are related to oral ulcer activity in Behcet's disease. Int J Dermatol. 2013;52(10):1198-201.

112. Novak T, Fortune F, Bergmeier L, Khan I, Hagi-Pavli E. Neutrophil elastase and endogenous inhibitors in Behcet's disease saliva. Clin Exp Immunol. 2020;202(1):93-105.

113. de Vargas RM, da Cruz MLN, Giarllarielli MPH, Sano BM, da Silva GI, Zoccal KF, et al. Vascular involvement in Behcet's disease: the immunopathological process. J Vasc Bras. 2021;20:e20200170.

114. Ogawa Y, Muto Y, Kinoshita M, Shimada S, Kawamura T. Neutrophil Extracellular Traps in Skin Diseases. Biomedicines. 2021;9(12).

115. Murad M, Low L, Davidson M, Murray PI, Rauz S, Wallace GR. Low density neutrophils are increased in patients with Behcet's disease but do not explain differences in neutrophil function. J Inflamm (Lond). 2022;19(1):5.

116. Safi R, Kallas R, Bardawil T, Mehanna CJ, Abbas O, Hamam R, et al. Neutrophils contribute to vasculitis by increased release of neutrophil extracellular traps in Behcet's disease. J Dermatol Sci. 2018;92(2):143-50.

117. Mandel P, Metais P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. C R Seances Soc Biol Fil. 1948;142(3-4):241-3.

118. Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. Front Immunol. 2019;10:502.

119. Bode W, Meyer E, Jr., Powers JC. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. Biochemistry. 1989;28(5):1951-63.

120. Zimmer M, Medcalf RL, Fink TM, Mattmann C, Lichter P, Jenne DE. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(17):8215-9.

121. Klebanoff SJ. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. J Exp Med. 1967;126(6):1063-78.

122. Inazawa J, Inoue K, Nishigaki H, Tsuda S, Taniwaki M, Misawa S, et al. Assignment of the human myeloperoxidase gene (MPO) to bands q21.3----q23 of chromosome 17. Cytogenet Cell Genet. 1989;50(2-3):135-6.

123. Babior BM. NADPH oxidase. Curr Opin Immunol. 2004;16(1):42-7.

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

125. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature. 1997;389(6648):251-60.

126. Thompson PR, Fast W. Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? ACS Chem Biol. 2006;1(7):433-41.

127. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA. 2013;310(20):2191-4.

128. Batu ED. Neutrophil-mediated Thrombosis and NETosis in Behcet's Disease: a Hypothesis. J Korean Med Sci. 2020;35(29):e213.

129. Li L, Yu X, Liu J, Wang Z, Li C, Shi J, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Aberrant Macrophages Activation in Behcet's Disease. Front Immunol. 2020;11:590622.

130. Mor F, Weinberger A, Cohen IR. Identification of alpha-tropomyosin as a target self-antigen in Behcet's syndrome. Eur J Immunol. 2002;32(2):356-65.

131. Okunuki Y, Usui Y, Takeuchi M, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, et al. Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. Exp Eye Res. 2007;84(5):823-31.

132. Lu Y, Ye P, Chen SL, Tan EM, Chan EK. Identification of kinectin as a novel Behcet's disease autoantigen. Arthritis Res Ther. 2005;7(5):R1133-9.

133. Vural B, Sehitoglu E, Cavus F, Yalcinkaya N, Haytural H, Kucukerden M, et al. Mitochondrial carrier homolog 1 (Mtch1) antibodies in neuro-Behcet's disease. J Neuroimmunol. 2013;263(1-2):139-44.

134. Vural B, Ugurel E, Tuzun E, Kurtuncu M, Zuliani L, Cavus F, et al. Anti-neuronal and stress-induced-phosphoprotein 1 antibodies in neuro-Behcet's disease. J Neuroimmunol. 2011;239(1-2):91-7.

135. Cantarini L, Pucino V, Vitale A, Talarico R, Lucherini OM, Magnotti F, et al. Immunometabolic biomarkers of inflammation in Behcet's disease: relationship with epidemiological profile, disease activity and therapeutic regimens. Clin Exp Immunol. 2016;184(2):197-207.

136. Amin MM, Abdel Latif OM. Anti-tubulin-alpha-1c antibody as a marker of value in Behcet syndrome. Clin Rheumatol. 2022;41(6):1759-67.

137. Prado LL, Goncalves CR, Viana VT, Saad CGS, Bonfa E. Anti-alpha-enolase antibodies in Behcet's disease: a marker of mucocutaneous and articular disease activity? Clin Exp Rheumatol. 2018;36(6 Suppl 115):28-32.

138. Deng J, Pan W, Ji N, Liu N, Chen Q, Chen J, et al. Cell-Free DNA Promotes Inflammation in Patients With Oral Lichen Planus via the STING Pathway. Front Immunol. 2022;13:838109.

139. Deger O, Orem A, Akyol N, Bahadir S, Yildirmis S. Polymorphonuclear leukocyte elastase levels in patients with Behcet's disease. Clin Chim Acta. 1995;236(2):129-34.

140. Wu S, Peng W, Zhang Y, Guo J, Fu J, Wang W. Correlation of PMN elastase and PMN elastase-to-neutrophil ratio with disease activity in patients with myositis. J Transl Med. 2019;17(1):420.

141. Qin J, Fu S, Speake C, Greenbaum CJ, Odegard JM. NETosis-associated serum biomarkers are reduced in type 1 diabetes in association with neutrophil count. Clin Exp Immunol. 2016;184(3):318-22.

142. Soomro AH, Khan E, Noori S, Lone MA, Syal Z, Sheikh S. Assessment of Cytokine Release against Oral Mucosal Cell Line Culture (TR146) Stimulated by Neutrophil Elastase Associated with Behcet's Disease. Int J Dent. 2019;2019:6095628.

143. Dogan P, Tanrikulu G, Soyuer U, Kose K. Oxidative enzymes of polymorphonuclear leucocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin, and copper levels in Behcet's disease. Clin Biochem. 1994;27(5):413-8.

144. Kose K, Dogan P, Ascioglu M, Erkilic K, Ascioglu O. Oxidative stress and antioxidant defenses in plasma of patients with Behcet's disease. Tohoku J Exp Med. 1995;176(4):239-48.

145. Melikoglu MA, Kacar C, Cort A, Yucel G, Aslan M. Oxidases and oxygenases in regulation of neutrophil redox pathways in Behcet's disease patients. J Enzyme Inhib Med Chem. 2012;27(1):12-7.

146. Ortiz GC, Rahemtulla B, Tsurudome SA, Chaves E, Rahemtulla F. Quantification of human myeloperoxidase in oral fluids. Eur J Oral Sci. 1997;105(2):143-52.

147. Caglayan F, Miloglu O, Altun O, Erel O, Yilmaz AB. Oxidative stress and myeloperoxidase levels in saliva of patients with recurrent aphthous stomatitis. Oral Dis. 2008;14(8):700-4.

148. Garley M, Dziemianczyk-Pakiela D, Ratajczak-Wrona W, Pryczynicz A, Nowak K, Lazarczyk B, et al. NETs biomarkers in saliva and serum OSCC patients: One hypothesis, two conclusions. Adv Med Sci. 2022;67(1):45-54.

149. Meegan JE, Yang X, Beard RS, Jr., Jannaway M, Chatterjee V, Taylor-Clark TE, et al. Citrullinated histone 3 causes endothelial barrier dysfunction. Biochem Biophys Res Commun. 2018;503(3):1498-502.

150. Zhang S, Lu X, Shu X, Tian X, Yang H, Yang W, et al. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. Intern Med. 2014;53(24):2763-71.

151. Durcan L, Petri M. The clinical and serological associations of hypocomplementemia in a longitudinal sle cohort. Semin Arthritis Rheum. 2020;50(5):1081-6.

152. Atzeni F, Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Sarzi-Puttini P, Pipitone N, et al. Lack of association of the -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism with Behcet's disease in Italian patients. Rheumatology (Oxford). 2007;46(10):1547-50.

153. Ramsaransing G, Teelken A, Prokopenko VM, Arutjunyan AV, De Keyser J. Low leucocyte myeloperoxidase activity in patients with multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003;74(7):953-5.

154. Magan-Fernandez A, O'Valle F, Abadia-Molina F, Munoz R, Puga-Guil P, Mesa F. Characterization and comparison of neutrophil extracellular traps in gingival samples of periodontitis and gingivitis: A pilot study. J Periodontal Res. 2019;54(3):218-24.

155. Zhu X, Chu CJ, Pan W, Li Y, Huang H, Zhao L. The Correlation between Periodontal Parameters and Cell-Free DNA in the Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Plasma in Chinese Patients: A Cross-Sectional Study. J Clin Med. 2022;11(23).

DESTEKLER

- Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: TTU-2021-38154).

- Şekil-1 Servier Medical Art kullanılarak ücretsiz olarak yapılmıştır.

- Şekil-2A BioRender kullanılarak ücretsiz olarak yapılmıştır (*Front Immunol*. 2019;10:665).

- Şekil-2B Carmelo Carmona-Rivera, PhD ve NIAMS Sistemik Otoimmunite Dalı Mariana J. Kaplan, MD, Şef tarafından çekilmiştir.
  https://www.flickr.com/photos/niams_nih/36318350842/
  Lisans izni: CC BY-NC-SA 2.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/)

EKLER

Ek-1: Klinik araştırmalar etik kurulu karar formu

Ek-2: Bilgilendirilmiş gönüllü onam formu