TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANKİLOZAN SPONDİLİTLİ HASTALARDA EKSOZOM PROFİLİNİN İNCELENMESİ

EMEL KARAKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğretim Üyesi, CAN ERZİK

İSTANBUL- 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Emel KARAKAYA

İmza

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesi, malzemelerin temini, deneylerin yapılması, sonuçların yorumlanması ve rapor haline getirilmesi gibi her aşamasında maddi-manevi desteğini esirgemeyen, beni sürekli sorgulamaya yönlendiren, bilimsel bilgi ve bu bilginin üretilme sürecine dair anlayışımı zenginleştiren ve gerçek bir hümanist olan tez danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Can ERZİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, çalışmalarım sırasında beni yüreklendiren doktorum Fuat TORUN'a ve yoğun çalışmalarım sırasında bana karşı gösterdikleri sabır, sağladıkları çalışma ortamı ve manevi destekleri nedeniyle aileme özellikle de sevgili annem Elife KARAKAYA ve sevgili babam Rıza KARAKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

EMEL KARAKAYA

14 Eylül 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ……... i
İÇİNDEKİLER……..... ii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ …….. v
ŞEKİL LİSTESİ ……....viii
TABLO LİSTESİ …….....ix
1. ÖZET……1
2. SUMMARY ……2
3. GİRİŞ ve AMAÇ ……3
4. GENEL BİLGİLER ……... 6
4.1. Spondiloartropatiler (SpA) …….. 6
4.2. Ankilozan Spondilit (AS) ……..…….. 6
4.2.1. Epidemiyoloji...…… 6
4.2.2. Fizyopatolojisi ve Klinik özellikleri …….. 7
4.2.2.1. Kas-iskelet sistemi tutulumu …… 7
4.2.2.2. Eklem dışı tutulum …….. 11
4.2.3. Tanısı ……..……13
4.2.4. Tedavisi ……..16
4.2.5. Etyoloji ve Patogenezi ……..…… 17
4.2.5.1. İmmünolojik, mikrobiyal ve hormonal faktörler ……... 17
4.2.5.2. AS'nin genetiği …….....18
4.2.5.2.1. MHC genetiği ve AS ilişkisi …… 18
4.2.5.2.2. HLA-B27'nin yapısı ve fonksiyonu …….....19
4.2.5.2.3. HLA-B27'nin AS patogenezindeki rolüne ilişkin hipotezler ……...22
4.2.5.2.4. MHC dışı genlerin AS ile ilişkisi ……..26
4.2.5.2.4.1. Endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1 (ERAP1) ……27
4.2.5.2.4.2. Interlökin-23 reseptör (IL-23R) ……28
4.2.5.2.4.3. RUNX3 …….30
4.2.5.2.4.4. CARD9 (caspase recruitment domain- containing protein 9) ……..31
4.2.5.2.4.5. PTGER4 ……..……..32
4.2.5.2.4.6. Interlokin-1 gen kümesi (IL-1) ……..……...32
4.2.5.2.4.7. 2p15 ……..…….....33

4.2.5.2.4.8. ANTXR2 …….....33
4.2.5.3. AS'de TNFa, IL-17, IFNg ve IL-12 pro-inflamatuar sitokinleri ……34
4.2.5.3.1. TNFa ……..35
4.2.5.3.2. IL-17 …….....37
4.2.5.3.3. IFNg …….....40
4.2.5.3.4. IL-12……...41
4.2.6. Araştırmanın Hipotezine Ve Yöntemine Dayanak Oluşturan Literatüre Dayalı Özet……...42
4.3. Eksozomlar……..44
4.3.1. Eksozomların fiziksel ve biyokimyasal özellikleri ……..……..45
4.3.2. Eksozom biyogenezi ……..…….....47
4.3.3. Eksozomların fonksiyonları ve inflamasyondaki rolü ……...49
4.3.4. Eksozom izolasyonu ……..51
4.3.5. Eksozom karakterizasyonu ……53
5. GEREÇ ve YÖNTEM……...58
5.1. Çalışma Tasarımı ……58
5.2. Çalışma Grupları ……58
5.3. Araştırmada İzlenen Yöntem ve Kullanılan Gereçler ……59
5.3.1. Katılımcılardan kan alma işlemi ……63
5.3.2. Serumdan eksozom izolasyonu ……..63
5.3.3. Filtratın saflık derecesinin tespiti ……...64
5.3.4. Eksozom konsantrasyonu ile AS arasındaki ilişki ……65
5.3.5. Eksozom yüzeyindeki belirteçlerin FC analizi ……..65
5.3.6. İstatistiksel Analiz ……..67
6. BULGULAR ……..69
6.1. BCA*(liziz-)* ve ELISA ile Saflık Tespiti ……69
6.2. BCA*(liziz+)* ile AS'de Eksozom Konsantrasyonundaki Değişim ……..70
6.3. Liziz İşleminin ve İnkübasyon Süresinin BCA Sonuçlarına Etkisi ……71
6.4. Eksozom Yüzeyindeki Belirteçlerin FC Analizi ……72
7. TARTIŞMA ve SONUÇ ……...78
8. KAYNAKLAR ……..83
9. EKLER ……..……...102

Ek-1: AS sürecinde aktif olan yapıların eksozom olduğunu doğrulayan çift pozitiflik analizi……..……...102
Ek-2: TSG101+ eksozomlar AS hastalarında kontrollere kıyasla daha fazladır 103
Ek-3: AS sürecinde aktif olan eksozomların kökenini gösteren flow sitometrik grafikler……..103
Ek-4: AS'de eksozomların sitokin profilini gösteren flow sitometrik grafikler ……..…….104
Ek-5: AS'de eksozomların sitokin profilini gösteren flow sitometrik grafikler ……..…….105
10. BİLİMSEL FAALİYETLER ……..……106

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

AS : Ankilozan Spondilit

ASAS: Uluslararası Spondiloartrit Değerlendirme Derneği

ANTXR2: Antraks toksin reseptörü 2

AFM: Atomik Kütle Mikroskobu

BASDAI: Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksi

b2m: beta2mikroglobulin

BSA: Sığır serum albümini

BCA: Bisinkoninik asit testi

CTL: Sitotoksik T lenfositi

Cys67: 67 pozisyonundaki sistein

CARD9: Caspase recruitment domain-containing protein 9

CD: Farklılaşma kümesi

Cryo-TEM: Kriyojenik iletim elektron mikroskobu

dk: dakika

DLS: Dinamik Işık Saçılımı

DPBS: Dulbecco Fosfat Tamponlu Salin

DMARD: Hastalık Modifiye Edici Antiromatizmal İlaçlar

EA: Enteropatik Artrit

ESSG: Avrupa Spondiloartropati Çalışma Grubu

ER: Endoplazmik Retikulum

ERAP: Endoplazmik retikulum aminopeptidaz 1

ESCRT: Taşıma için gerekli endozomal sınıflandırma kompleksleri

EV: Hücredışı Vezikül

ELISA: Enzime bağlı immünosorbent testi

FC: Akış Sitometrisi

FL: floresan

FMO: Floresan Eksi Bir

GWAS: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları

HLA-B27: İnsan Lökosit Antijenleri-B27

IgG: Immunoglobulin G

ISEV: Uluslararası Hücredışı Veziküller Derneği

ILV: Intraluminal Vezikül

IL-: Interlökin

IL-23R: Interlökin 23 reseptörü

IFNg: Interferon gamma

IBD: Inflamatuvar Bağırsak Hastalığı

JKA: Jüvenil Kronik Artrit

JAK: Janus tirozin kinaz

KIR3DL2:Üç bölge, 2 uzun stoplamik kuyruk içeren katil hücre immünoglobulin benzeri reseptör

mAS : Hafif Ankilozan Spondilit

mTNFa: membran TNFa

MHC: Ana Doku Uyumluluk Kompleksi

MVB: Multiveziküler cisim

MFI_{pos}: Pozitif populasyonun ortalama floresan yoğunluğu

MFI_{neg}: Negatif popülasyonun ortalama floresan yoğunluğu

min-mak: minimum-maksimum

NTA: Nanoparçacık İzleme Analizi

NF-kB: Nükleer faktör kappa B

NK: Doğal Katil Hücre

NKT: Doğal Katil T Hücresi

NSAID: Steroid dışı yangı önleyici ilaçlar

PBMC: Periferik Kan Mononüklear Hücre

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PTGER4: Prostoglandin E Reseptör 4

PsA: Psoriatik Artrit

RPS: Dirençli Darbe Algılama

RIPA: Radyo-immünopresipitasyon deneyi

RANKL: Nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü

RA: Romatoit Artrit

ReA: Reaktif Artrit

RUNX3: RUNX ailesi transkripsiyon aktivatörü 3

SK: Sağlıklı Kontrol

SS: Standart Sapma

SEC: Boyut Dışlama Kromatografisi

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

sTNFa: çözünür TNFa

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

SpA : Spondiloartropati

sAS: Şiddetli Ankilozan Spondilit

σ_{neg}: Negatif popülasyonun standart sapması

TCR: T hücre reseptörü

TAP: Antijen Sunumu ile İlişkili Taşıyıcı

Th: Yardımcı T Hücresi

TYK: Tirozin kinaz

TNFa: Tümör nekroz faktörü- alfa

TACE: Tümör nekroz faktörü alfa dönüştürücü enzim

TLR: Toll Benzeri Reseptör

TSG101: Tumör duyarlılığı geni 101

TEM: Geçirimli Elektron Mikroskobu

uSpA: (Farklılaşmamış Spondiloartropati

UPR: Katlanmamış Protein Tepkisi

µl: mikrolitre

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Bambu omurgası

Şekil 2. AS'de görülen postür değişikliği

Şekil 3. MHC sınıf I, II ve III bölgelerinin yerleşimi

Şekil 4. HLA-B27 molekülünün hücre içi ve hücre dışı kısımlarının şematik gösterimi

Şekil 5. MHC Sınıf I Antijen Sunum Yolağı

Şekil 6. AS patogenezinde artritojenik peptid hipotezi

Şekil 7. ER'ye yerleşik ve hücre yüzeyi HLA-B27 dimerlerinin farklı patojenik roller

Şekil 8. Antijen işleme ve sunumunda endoplazmik retikulum aminopeptidazlarının rolünü gösteren şematik diyagram

Şekil 9. AS'nin patogenezinde rol alan IL23/IL17 immün aksının şematik gösterimi

Şekil 10. Patojenik proinflamatuar sitokinleri teşvik etmek için CARD9'dan sinyal veren mikrobiyal beta-glukan ve dektin-1'in etkileşimi

Şekil 11. IL23/IL17 yolağı

Şekil 12. Eksozomların kompozisyonu ve hedef hücre ile etkileşimi

Şekil 13. ESCRT'ye bağlı ve ESCRT'den bağımsız eksozom biyogenezi

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Ankilozan Spondilit için Modifiye New York kriterleri

Tablo 2. Radyografik sakroileitin derecelendirilmesi

Tablo 3. Aksiyal SpA için ASAS sınıflandırma kriterleri

Tablo 4. Periferik SpA için ASAS sınıflandırma kriterleri

Tablo 5. Hasta ve sağlıklı gönüllülerin klinik özellikleri

Tablo 6. BCA(liziz-) ile *filtrat ve serumun* saflık analizi

Tablo 7. İzolasyon için kullanılan yöntemin güvenirlik açısından değerlendirilmesi

Tablo 8. Albumin konsantrasyonunun belirlenmesi

Tablo 9. BCA*(liziz+)* ile eksozomal total protein konsantrasyonunun değerlendirilmesi

Tablo 10. Lizis yönteminin BCA sonuçlarına etkisinin değerlendirilmesi

Tablo 11. Çalışma gruplarına göre eksozomal yüzey belirteçlerinin analizi

Tablo 12. AS şiddetine göre eksozomal yüzey belirteçlerinin analizi

Tablo 13. Çalışma gruplarına göre eksozomal yüzey belirteçlerinin çift pozitiflik analizi

Tablo 14. AS şiddetine göre eksozomal yüzey belirteçlerinin çift pozitiflik analizi

1.ÖZET

Tezin başlığı: Ankilozan Spondilitli Hastalarda Eksozom Profilinin İncelenmesi
Öğrencinin Adı, Soyadı: Emel KARAKAYA
Danışmanın Adı, Soyadı: Can ERZİK, Dr. Öğretim Üyesi
Programın Adı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans

Amaç: Bu çalışmada, hücre-hücre iletişiminin temel komponentleri olan eksozomların kronik, sistemik ve inflamatuvar bir hastalık olan ankilozan spondilit (AS) patogenezindeki olası rolü ve bu eksozomların kökeni araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: 10 AS hastası ve 10 sağlıklı kontrolden elde edilen serum içerisindeki eksozomlar, önce fiziksel özelliklerinden yararlanılarak Izon $qEV_{2/35}$ nm kolonları ile, ardından biyokimyasal özelliklerinden yararlanılarak CD9, CD63 ve CD81 antikorlarıyla kaplı 3 um çapındaki manyetik boncuklar ile izole edilmiştir. Filtratın saflığını değerlendirmek için BCA ve ELISA testleri yapılmıştır. Eksozom varlığını doğrulamak, eksozomların kökenini ve sitokin profilini ortaya çıkarmak için flow sitometri analizi ile eksozom yüzey belirteçleri karakterize edilmiştir. Eksozom konsantrasyonu ile ilgili flow sitometri bulgusunu desteklemek amacıyla, eksozom konsantrasyonu ile AS arasındaki ilişki BCA yöntemi ile test edilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Flow sitometri analizinde, AS grubunun CD86+TSG101+ ve CD3+TSG101+ eksozom yüzdeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$). CD3+IL17+ ve CD3+IFNg+ ile CD86+TNFa+ ve CD86+IL12(p35)+ eksozom yüzdeleri açısından AS ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.01$).

Sonuç: AS sürecinde T hücre türevli eksozomların oranı ve bu eksozomların memranındaki IL-17A ve IFNg sitokin ekpresyon seviyeleri ile makrofaj türevli eksozomların ve bu eksozomların membranındaki TNFa ve IL-12(p35) sitokin ekspresyon seviyeleri artmıştır. Fakat eksozom profili AS seyrine göre değişmemiştir.

Anahtar kelimeler: Eksozom, hücre dışı vezikül, ankilozan spondilit, hücre yüzeyi belirteçleri

2.SUMMARY

Title of Thesis: Examination of Exosome Profile in Patients with Ankylosing Spondylitis
Student Name, Surname: Emel KARAKAYA
Supervisor Name: Can ERZİK, Dr. Lecturer
Program Name: Msc. inMedical Biology and Genetics

Objective: In this study, the possible role of exosomes, which are the main components of cell-cell communication, in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (AS), a chronic, systemic and inflammatory disease, and the origin of these exosomes were investigated.

Material and Methods: Exosomes in serum obtained from 10 AS patients and 10 healthy controls were first isolated with Izon qEV2/35 nm columns using their physical properties, and then with 3 μm diameter magnetic beads coated with CD9, CD63 and CD81 antibodies using their biochemical properties. BCA and ELISA tests were performed to evaluate the purity of the filtrate. Exosome surface markers were characterized by flow cytometry analysis to confirm the presence of exosomes and reveal the origin and cytokine profile of exosomes. In order to support the flow cytometry finding about exosome concentration, the relationship between exosome concentration and AS was tested with the BCA method and the results were compared.

Results: In FC analysis, CD86+TSG101+ and CD3+TSG101+ exosome percentages of AS group were significantly higher than control group ($p<0.05$). A significant difference was found between AS and control groups in terms of CD3+IL17+ and CD3+IFNg+, CD86+TNFa+ and CD86+IL12(p35)+ exosome percentages ($p<0.01$).

Conclusion: In the AS process, the ratio of T cell-derived exosomes and IL-17A and IFNg cytokine expression levels in the membrane of these exosomes, the ratio of macrophage-derived exosomes and TNFα and IL-12(p35) cytokine expression levels in the membrane of these exosomes increased. However, the exosome profile did not change according to the course of AS.

Keywords: Exosome, extracellular vesicle, ankylosing spondylitis, cell surface markers

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Temelde sakroiliak, aksiyel ve periferik eklemlerde artrit, daktilit ve entezit şeklinde kendini gösteren ve mide-bağırsak iltihabı, üveit gibi birçok sisteme ait bulgularıda olan, immün aracılı heterojen bir grup enflamatuvar hastalık seronegatif spondiloartropati (SpA) olarak adlandırılır (Delay ve ark, 2009). Oldukça sık görülen bu kronik romatizmal hastalık grubunun içerisinde ankilozan spondilit (AS), psoriatik artrit (PsA), kolitik artrit (Crohn hastalığı veya ülseratif kolit ile ilişkili), reaktif artrit (ReA), inflamatuar bağırsak hastalıkları (IBD) artropatileri, undiferansiye spondiloartropatiler (uSpA), jüvenil kronik artritler (JKA) (Brown, 2011; Sen ve ark, 2021; Li-Wearn, 2017; Snyder, 2021) yer alır.

SpA'ların prototipi AS'dir. Kronik, oldukça heterojen, progresif bir hastalık olan ve dünyada görülme sıklığı %0,6 ile %1,4 arasında değişen AS, öncelikle sakroiliak eklemleri ve aksiyal iskeleti etkileyerek önemli yapısal ve fonksiyonel bozulmaya neden olabilir (Shamji ve ark, 2008; Ghasemi-Rad ve ark, 2015; Wenker ve Quint, 2022). Başlangıçta sinsi olarak başlar ve birkaç yıl içerisinde radyolojik sakroileite ilerler; yani AS'nin bilinen en erken belirtisi "sakroileit"tir (Sieper ve ark, 2009). Sakroileit, omurganın alt bölümü olan sakrum ile pelvisin oluşturduğu sakroiliak eklemde meydana gelen iltihaplanmadır. AS'li hastalar sadece aksiyel tutulum gösterebilecekleri gibi, periferal eklemler ve eklem dışı yapılar da etkilenebilir: Periferik eklem iltihabı, ekstra-spinal belirtiler ya da ekstra-iskelet iltihabı (ör: üveit) da olabilirler (Garcia-Montoya ve ark, 2018; Khanna ve Tassiulas, 2022). Bu heterojenite, günlük klinik uygulamada hastalık aktivitesini ve şiddetini belirlemek için problem teşkil eder (Sidiropoulos ve ark, 2008).

Ayrıca, tüm vücudu tutan romatizmal bir hastalık olan AS'nin erken dönemde tanısı oldukça zordur. Bel ağrısı sadece AS'ye özgü bir belirti olmadığı için, hastalar yanlış hekime yönlendirildiği için ve tanı konulmasını sağlayan radyolojik bulgular hastalığın sadece ileri evrelerinde gözlenebildiği için hastalık başladıktan yaklaşık 5-11 yıl sonra kişiye AS tanısı konmaktadır (Ersözlü Bozkırlı, 2011; Magrey ve ark, 2020; Berke ve ark, 2019).

Öte yandan, bu kronik enflamatuvar hastalığın potansiyel engelleyici sonucu net bir sosyoekonomik etkiye de sahiptir (Taser ve ark, 2017; Saidane ve ark, 2018). Semptomatik AS hastaları iş özürlülüğü ve işsizlik nedeniyle üretkenliğini kaybeder, sağlık kaynaklarını önemli ölçüde kullanır ve yaşam kaliteleri düşer (Sieper ve ark, 2002; Elolemy ve ark, 2020). Kişinin aktif olması gereken yaşlarda yaşadığı bu sorunlar kişide duygudurum

bozukluklarına, depresyona ve anksiyeteye de yol açabilir (Park ve ark, 2019). Bu nedenlerle AS, hem kişi üzerinde hem ülke ekonomisi üzerinde olumsuz etkiler yaratır.

Bunlara rağmen, AS hastalığının seyrini değiştirebilecek etkili biyolojik tedavi yöntemleri henüz mevcut değildir. Varolan tedavi yöntemlerinin etkisi sınırlı olup sadece hastalığın semptomlarını rahatlatmaktadır. Hastalığın hem bireyin yaşamındaki hem de ülke genelindeki yıkıcı etkisini azaltmak için daha etkili erken tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekir. Ancak ve ancak, AS'nin altında yatan enflamatuvar süreçleri hedef alan biyolojik tedaviler semptomları gidermenin yanı sıra hastalık sürecini de olumlu yönde değiştirebilir (Sieper ve ark, 2002). Erken tanı ve etkili tedavi yöntemleri hastalığın etiyolojisi ve patogenezi ile ilgili bilgi birikimine bağlıdır.

AS'nin immün aracılı bir hastalık olduğuna, doğal ve adaptif immün hücreleri ve bunların sitokin salgılarının AS'de rol oynadığına dair Duftner ve diğ.2003, Límón-Camacho ve diğ. 2012, Raffeiner ve diğ. 2005, Wang ve diğ. 2015, Zhao ve diğ.2017 gibi çok sayıda çalışma mevcut olsa da hastalığın etiyolojisi ve patogenezi kesin olarak bilinmemektedir. Bu eksiklikten hareket eden bu çalışma, hastalığın patogenezine ışık tutabilecek bulgular elde etme amacıyla yapılmıştır. Ortaya konacak bu bulgular, AS hastalığı ile bilgi birikimine katkıda bulunabilir, var olan tanı ve tedavi yöntemlerinin revize edilmesi için bilimsel destek sağlayabilir. Bu yönüyle hem bilimsel literatüre hem de uygulamaya önemli katkılar getirecektir.

Son zamanlarda yapılan birçok araştırmaya göre, ekstrasellüer veziküller (EV) immünomodülasyona katılıp otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynar ve bu hastalıkların tanı ve tedavisinde büyük potansiyele sahiptir (Zhang ve ark, 2021). Literatürde yer alan bazı çalışmalar romatoit artrit (RA) gibi bazı romatizmal hastalıkları bir tür EV olan eksozomlar ile ilişkilendirmekte ve sinoviyal sıvı eksozomlarının -AS sürecinde de gözlenen- inflamasyona, eklem hasarına ve kıkırdak dejenerasyonuna neden olduğunu bildirmektedir (Withrow ve ark, 2016; Schioppo ve ark, 2021; Miao ve ark, 2022; Lin ve ark, 2021; Song ve ark, 2021; Zhang ve ark, 2021; Jafarpour ve ark, 2022). Bu çalışmada ise, AS hastalık süreci ile eksozomlar arasında bir ilişki olabileceği; hastalığın patogenezinde rol alan periferik kan mononükleer hücrelerin (PBMC) birbirleriyle ve inflamatuar bölge ile iletişimini sağlayabilmek amacıyla eksozom oluşturduğu varsayılmaktadır. Ayrıca bu eksozomların AS'nin oluşumu ve gelişimi için önemli pro ve/veya anti-inflamatuvar sitokinleri taşıdığı ve

hastalığın seyrine göre hastaları birbirinden ayırabilecek prognostik bir belirteç olabileceği ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada *"AS sürecinde eksozom profili nasıl değişir?"* sorusuna cevap aranmıştır. Bu ana sorun altında, bu çalışmada ele alınan sorular şunlardır:

1. Eksozom yoğunluğu (eksozomal protein konsantrasyonu) ile AS arasında bir ilişki var mıdır?
2. Hastalığın patogenezinde rol oynayabilen eksozomların kökeni hangi hücrelerdir?
3. Eksozomların sitokin profilleri ile AS hastalığı ve seyri arasında bir ilişki var mıdır?

Bu nedenle, AS hastalarının PBMC türevli eksozom profilleri (oranlarındaki farklılıklar, kökenleri ve sitokin ekspresyonları) gönüllü sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Spondiloartropatiler (SpA)

Spondiloartropatiler (SpA) türlü klinik, immünolojik ve kalıtsal özellikleri paylaşan, sakroiliak eklem, vertebra, periferik eklem ve tendon, ligament ve eklem kapsülünün kemiğe bağlanma bölgelerindeki inflamasyon ile karakterize, multisistemik bir romatizmal hastalık grubudur (Ward ve ark, 2016; Sen ve ark, 2021). Reaktif artrit (ReA), Psoriatik artrit (PsA), yangısal bağırsak hastalığı (IBD), ülseratif kolit ve Crohn hastalığının dahil olduğu Enteropatik artrit (EA), farklılaşmamış spondiloartropati (uSpA) ve jüvenil spondiloartropati gibi hastalıkların yer aldığı bu grubun prototipi Ankilozan Spondilit (AS)'dir (Brown, 2011; Li-Wearn, 2017; Snyder, 2021). Genellikle gençleri etkileyen spondiloartropatilerin genel popülasyonda görülme sıklığı %0,2-1,61'dir (Stolwijk ve ark, 2016).

Spondiloartropatiler;

- sakroiliak ve vertebral eklemlerin tutulumunu gösteren semptomların baskın olduğu durum "aksiyal SpA",
- tendon, ligament ya da eklem kapsülü bağlantılarının ve periferal eklemlerin inflamasyonunu gösteren semptomların baskın olduğu durum "periferik SpA"

olarak sınıflandırılabilir (Sudol-Szopinska ve Urbanik, 2013).

Aksiyal SpA ise;

(1) Sakroiliak eklemde radyolojik değişikliklerin eşlik ettiği AS,

(2) HLA-B27 antijeni varlığı ve manyetik rezonans görüntülemede (MRI) sakroileitin eşlik ettiği radyolojik olmayan aksiyal SpA

olmak üzere 2 alt gruba ayrılır (Karadeniz, 2014; Van Der Linden ve ark, 1984). Radyolojik olmayan SpA birkaç yıl içerisinde AS'ye ilerleyebilir (Karadeniz, 2014; Van Der Linden ve ark, 1984).

4.2. Ankilozan Spondilit (AS)

4.2.1. Epidemiyoloji

Toplumda sık görülen romatizmal bir hastalık grubu olan spondiloartropatilerin (SpA) en önemli örneğini Ankilozan Spondilit (AS) oluşturur. Değişik coğrafik bölge ve etnik kökene göre farklılık gösteren AS prevalansı, hastalığa karakteristik özellikler hastalığın ilk evrelerinde kendini gizlediği ve teşhisin konulması yaklaşık 6 yıl geciktiği için, kesin olarak

tespit edilememiştir (Kınıklı, 2014). Otuz altı çalışmadan elde edilen sonuçlara göre her 10.000 kişilik populasyon için AS prevalansı Avrupa'da 23,8, Afrika'da 7,4, Kuzey Amerika'da 31,9, Latin Amerika'da 10,2, Asya'da 16,7'dir (Dean ve ark, 2014). AS'nin Türkiye'de görülme sıklığı ile ilgili ilk çalışma askere alınmış 20-22 yaş aralığındaki 1436 erkek üzerinde yapılmış ve AS sıklığı %0,14 olarak tespit edilmiş (Akar ve Önen, 2007). Ancak bu tarama sadece erkeklerde ve AS'nin beklenen ortalama başlangıç yaşından daha genç bireylerde yapılmıştır. Klasik AS'li olguların sıklıkla askerliğe alınmayışı yanında, AS'nin radyoloji bulgularının ortaya çıkışı için gereken süre göz önüne alındığında bulunan prevalans değerinin gerçek değerin çok altında olması beklenir (Akar ve Önen, 2007). AS prevalansı Türkiye'nin Doğu Karadeniz bölgesinde 20 yaş üzeri 4031 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada %0,25, İzmir'de 20 yaş üzeri 2835 kişi ile yapılan bir çalışmada %0,49 ve Türkiye'nin batısında yer alan Havsa ilçesinde 18771 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada %0,12 olarak bulunmuştur (Akkoç, 2010; Karkucak ve ark, 2011; Çakır ve ark, 2012).

4.2.2. Fizyopatoloji ve klinik özellikler

AS,aksiyel ve periferik iskelet inflamasyonunun yanı sıra göz, kalp, böbrek, akciğer, bağırsak gibi çoklu organ tutulumu da gösterebilen, vücudun tamamını etkileyebilen heterojen, sistemik enflamatuar bir hastalıktır (Khanna ve Tassiulas, 2022). Bu nedenle AS hastalığının klinik bulguları iki grupta incelenecektir: (1) kas-iskelet sistemi tutulumu, (2) eklem dışı tutulum (Kıbrıslı ve ark, 2015).

4.2.2.1. Kas-iskelet sistemi tutulumu

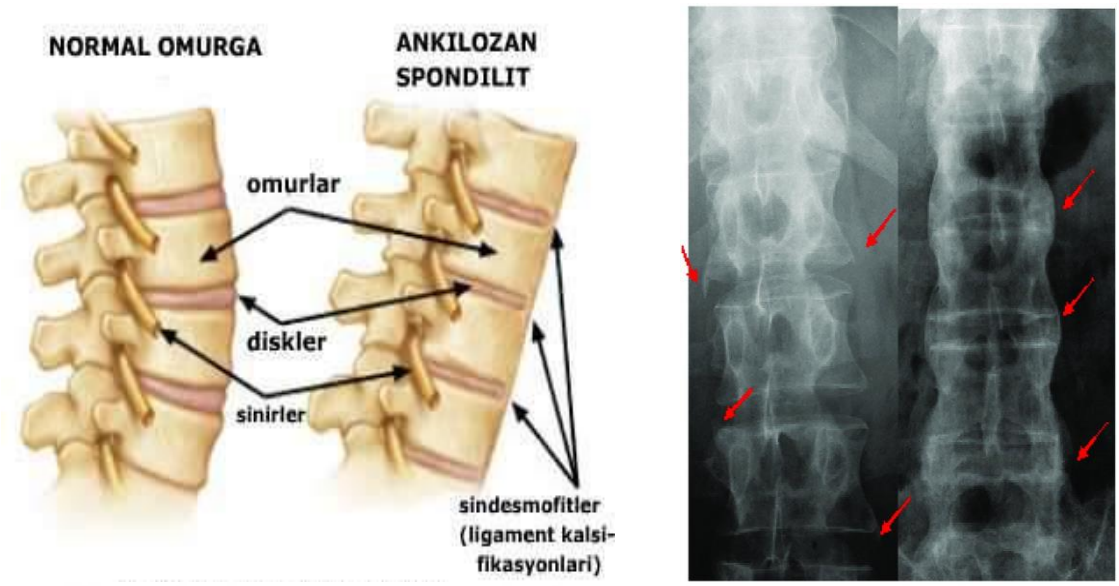
AS, sakrum ve pelvis kemikleri arasında her iki yanda yer alan ve ortalama 17,5 santimetre (sm) uzunluğunda en büyük aksiyel eklem olan sakroiliak eklemlerde aksiyel iskelet tutulumu ile (eklemlerin inflamasyonu ile) başlar (Safrany ve ark, 2009; Tilwavala ve ark, 2018). Sakroiliak eklemlerde başlayan bu inflamasyon (sakroileit), AS hastalarının %75'inde ilk yakınma olan inflamatuar sırt/bel ağrısına neden olur (Landewe ve ark, 2009; Koyuncu, 2014; Sarıkaya Pekacar, 2015). Bu ağrı klinik olarak mekanik tipteki bel ağrısından bir takım farklılıklar gösterir (Karataş, 2015). Genellikle 40 yaşın altında başlayan, sinsi, en az 3 ay boyunca süren, gecenin ikinci yarısı ve sabah saatlerinde ağırlaşan ve hareketsizlilikle (dinlenmeyle) daha da artan ve egzersizle azalan, 45 dakikayı aşan sabah tutukluluğunun eşlik ettiği, non-steroid anti-inflamatuar ilaç tedavisi ile azalan bir ağrıdır (Gündüz ve Erdal, 2014; Koyuncu, 2014; Kıbrıslı ve ark, 2015). Başlangıçta ağrı tek taraflı veya intermittan iken, genellikle birkaç ay içinde devamlı ve iki taraflı hale gelir (Sieper ve ark,2009; Gündüz ve

Erdal, 2014). Ancak, inflamatuar bel ağrısının varlığı sakroilileit için güvenilir bir gösterge değildir(Sieper ve ark, 2002). Sakroileit genellikle sağ ve sol gluteal bölgelerde yer değiştiren ağrıya da neden olur (Koyuncu, 2014), yani sakroiliak tutulum kalça ağrısı olarak da hissedilebilir (Ersözlü Bozkırlı, 2011). Gluteal ağrı uyluğun önünden ve arkasından dize kadar yayılabilir ve dinlenme ile belirginleşirken aktivite ile yatışır (Taş, 2013). Sakroiliak eklemin ön ve alt bölgesinde meydana gelen inflamasyon, manyetik rezonans görüntülümede hastalığın ilk evrelerinde ekleme komşu kemiklerde kemik iliği ödemi veya osteit şeklinde kendini gösterir (Rudwaleit ve ark, 2009; Taş, 2013). Sakroiliak eklemlerde gözlenen en erken değişiklikler subkondral kemiğin kortikal kenarlarının bulanıklaşması, erozyonlar ve sklerozdur (Sieper ve ark, 2002). Erozyon ilerledikçe eklem alanı daha geniş görünür ve daha sonra fibröz ve kemik ankilozis eklemi yok eder (Sieper ve ark, 2002).

Sakroiliak eklemlerde başlayan inflamasyon, hastalığın seyriyle omurganın diğer bölümlerine (torakal ve servikal omurgaya) de yayılır (Landewe ve ark, 2009; Weisman, 2012). Hastalığın en karakteristik özelliği ligament, tendon ve kapsüllerin kemiğe yapışma yerinde (entezis bölgelerinde) meydana gelen inflamasyondur (Sarıkaya Pekacar, 2015), yani entezit (entesopati)'dir. Sert ve yumuşak dokuların birleştiği bölgeyi temsil eden entezler, sadece kemik bağlanma arayüzünün ve entezin kendisi üzerinde değil, aynı zamanda fibrokartilaj, bursa, trabeküler kemik ağları, fasya gibi komşu dokularda da etkileri olan konsantre stres bölgeleri, tekrarlayan biyomekanik kuvvetlerin bir bölgesidir (Kehl ve ark, 2016). Entezdeki yüksek biyomekanik stres, komşu sinoviyal dokudaki monositleri ve lenfositleri sızdırarak sitokin üretimine neden olan bir inflamatuvar kaskadı tetikler, eklemde iltihabik bir tepkiye neden olur ve klinik olarak bağlanma bölgelerine komşu sinovite yol açar (Kehl ve ark, 2016).

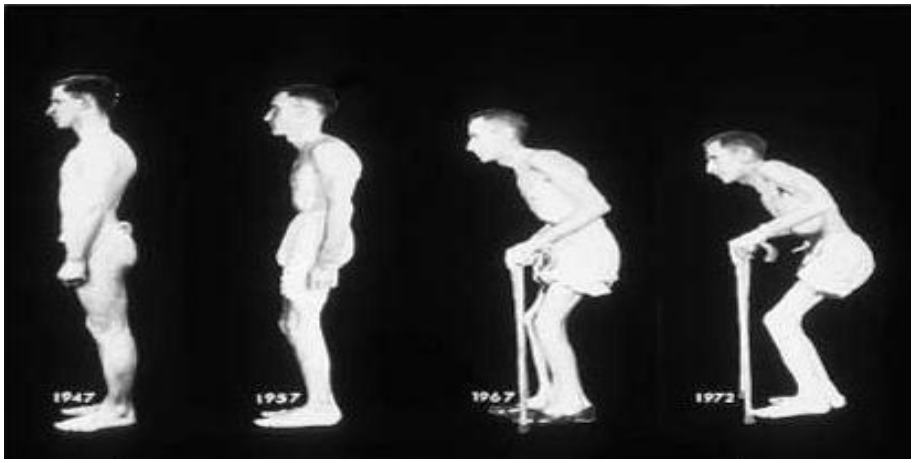
Enteziti, etkilenen eklemlerin füzyonuna yol açan kemik oluşumu (sindesmofit) izler (Evans ve ark, 2011). İntervertebral disklerin annulus fibrozis denen dış tabakasının vertebra köşelerine yapıştığı yerlerdeki entezite bağlı olarak, hastalığın erken evrelerinde eroziv değişiklikler meydana gelir (Tam ve ark, 2010) ve sonraki evrelerde annulus fibrozisin dış kenarı boyunca ilerleyen fibroblast proliferasyonu vertebral cisimcikler arasında ve daha sonra omurga üzerinde ossifikasyonla sonlanır (Wolf, 2012). Bunun sonucunda vertebralar arası ince kemikler meydana gelir. Bu kemik köprülere *sindesmofit* adı verilir. Şekil 1'de olduğu gibi, bu sindesmofitler ve komşu vertebral cisimler birbirleriyle kaynaştığında omurga tek bir parça gibi görünür ve *bambu omurgası* olarak tanımlanır (Tam ve ark, 2010).

a) b)



Şekil 1. Bambu omurgası (a) Omurların kaynaşarak bambu kamışı görünümü oluşturması (https://turanuslu.net/es/ankilozan-spondilit/ adresinden 10 Eylül 2022 tarihinde alınmıştır). (b) Omurgada sindesmofitlerin X-ray görüntüsü; solda, AS'li 30 yaşındaki bir erkeğin omurgasında büyüyen sindesmofitler; sağda, AS'li 37 yaşındaki bir erkeğin omurgasındaki bitişik vertebral cisimler arasında köprü oluşturan, röntgende bambu omurga görüntüsünden sorumlu çoklu sindesmofitler (Bielecka ve ark, 2018'den alınmıştır.)

Eklemin hareketliliğinin azalması ya da bütünüyle yok olması nedeniyle eklem işlevini yapamaz duruma gelir, spinal esneklik ve hareket kaybı sonucu, omurganın herhangi bir kısmının bükülmesi imkansız hale gelir (Wolf, 2012). Şekil 2'deki gibi, önce lomber lordozun azaldığı, sonra dorsal kifozun arttığı ve hastalığın ileri evresinde boynun öne doğru eğrildiği bir postür ortaya çıkar (http://www.romatolojiatlasi.com, Erişim tarihi: 18 Temmuz 2022). Ayrıca minimum travmatik hasarı olan veya hiç olmayan ankiloze omurgalı hastalarda omurilik sıkışmasına neden olabilen vertebra kırığı gelişebilir (Dakwar ve ark, 2008).



Şekil 2. AS'de görülen postür değişikliği (Özaltun,2017'den alınma)

Kısacası, entezis bölgelerinde inflamasyon, kemik erozyonu ve yeni kemik oluşumu olmak üzere üç süreç gözlenir (Tam ve ark, 2010). Yeni kemik oluşum süreci AS hastalarında farklılıklar göstermekte, bazı hastalarda tüm hastalık süresi boyunca hiç sindesmofit gelişmezken, bazılarında hızla spinal füzyon gelişmektedir (Özen ve ark,2017). Enflamasyonun nasıl başladığı ve kemik oluşumuna ve nihayetinde ankilozise doğru nasıl ilerlediği çok az anlaşılmıştır (Haynes ve ark, 2012). Enflamasyonun doğrudan osteoproliferasyona yol açıp açmadığı, kemik oluşumunun indüksiyonundan önce durup durmadığı ya da inflamatuar ve osteoproliferatif fazların tamamen birbirinden ayrılıp ayrılmadığı da dahil olmak üzere inflamasyon ve osteoproliferasyonun nasıl bağlantılı olduğu tartışılmaktadır (Haynes ve ark,2012).

Entezler aksiyel iskelet ile sınırlı değildir, ayrıca ligament ve tendonların kemiğe tutunduğu periferik iskelette de bulunur (Tam ve ark, 2010). Entezit, periferik eklem tutulumunun bileşenidir (Ersözlü Bozkırlı, 2011). Aksiyel iskelet dışında omuz ve kalça eklemleri en sık tutulan periferik eklemlerdir; hastaların yaklaşık %50'si etkilenir (Karataş, 2015). Juvenil başlangıçlı olanlarda kalça tutulumu daha sık görülmektedir (Ersözlü Bozkırlı, 2011). AS'li hastaların %30'unda ise dirsek, metakarpofalangeal ve metatarsofalangeyal eklemlerde de artrit görülebilir (Kınıklı, 2014; Pehlivan, 2013). Periferik eklem tutulumu hastalığın herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilir ve daha agresif bir ilerlemenin göstergesi olabilir (Wolf, 2012). El ve ayak parmaklarında diffüz şişlikle karakterize daktilit (*sosis parmak*: parmaktaki fleksör tendonun iltihaplanması nedeniyle parmağın şişmesidir) görülebilir.

AS'de alt ekstremitelerin entezleri üst uzuvlarınkinden daha sık tutulur (Kehl ve ark, 2016). Entezitin en çok etkilediği omurga dışı bölgeler, kalkaneus'da plantar fasiyanın ve aşil tendonunun bağlantı yerleridir ve topukta ağrı ve hareket yeteneğinde azalmaya neden olur (Pang ve Davis, 2008).

AS'nin önemli bir bulgusu osteoporozdur. AS ve osteoporoz arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır (Ramirez ve ark. 2018). İleri sürülen bir mekanizmaya göre, AS'de karakteristik olarak üretilen TNFa, IL-1, IL-6 ve IL-17 gibi inflamatuvar sitokinler osteoklast aracılı kemik rezorbsiyonunu aktive ederek kemik yıkımına

neden olur(Kim ve ark, 2022; Kwok ve Chung, 2022; Hinze ve Louie, 2016). Bu nedenle AS'li hastalarda omurların kortikal bölgelerinde patolojik yeni kemik oluşumu ile eş zamanlı olarak omur gövdelerinin merkezinde trabeküler kemik kaybı gerçekleşebilir(Sindel ve ark, 2012; Kim ve ark, 2022). Vertebral trabeküler kemik kaybı kemik mineral yoğunluğunun (KMY) düşmesine neden olur (Klinberg ve ark, 2012). Düşük KMY ise, yaygın sindesmofit oluşumu ile birlikte vertebral kırık riskinin artmasına neden olur (Kim ve ark, 2022); rijit ve ankiloze vertebrada minimal travma ile bile kırık oluşabilir (Karataş, 2015). Vertebral kırıklar ise kişinin yaşam kalitesini düşerebileceği gibi, mortalite artışına da neden olur (Pang ve Davis, 2008). Vertebral kırıklar, minör travmadan sonra lokalize keskin ağrı atakları ile karakterizedir (Malochet-Guinamand ve ark, 2017). Ağrının şiddetlenmesini önlemek için hastalar yatağında hareketsiz kalır ve ağrıları genellikle 4-6 hafta sonra düzelir (Malochet-Guinamand ve ark, 2017). AS sürecinde osteoporoz oluşumuna, ayrıca, ankiloza bağlı olarak fiziksel fonksiyonun azalması, D vitamini reseptörünün genetik polimorfizmleri, düşük osteoprotogerin ve seks steroid hormonları, bozulmuş kalsiyum ve D vitamini emilimi gibi birbirleriyle bağlantılı olabileceği düşünülen çeşitli faktörler de AS'de kemik kaybına neden olur (Kwok ve Chung, 2022). Ancak, patolojik yeni kemik oluşumu KMY'yi olduğundan daha fazla gösterebildiği için spinal osteoporozu teşhis etmek zordur (Klinberg ve ark, 2012). Çalışmaların çoğu aksiyel SpA'lı hastaların genel popülasyonda beklenenden daha yüksek osteoporoz prevalansına sahip olduğunu göstermektedir (Malochet-Guinamand ve ark, 2017). Gözlemsel çalışmaların bir meta analizinde AS'de osteoporoz prevalansı %11.7 ila %34.4 arasında değişmiştir (Ramirez ve ark, 2018). Bu oran ABD'de 50 yaşından büyük AS hastalarında %23, Çin'de %31, Fransa'da %13'tür (Kwok ve Chung, 2022).

4.2.2.2.Eklem Dışı Tutulum

Sistemik inflamatuar bir hastalık olarak AS, tek bir organ veya vücudun bir kısmı ile sınırlı değildir. Anterior üveit, sedef hastalığı ve kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi spesifik organ tutulumu, eş zamanlı olarak kardiyovasküler veya pulmoner komplikasyon riski eşliğinde ortaya çıkabilir (Chen ve ark, 2017).

Oftalmolojik Tutulum: AS'de en sık görülen eklem dışı tutulum olan akut anterior üveit, iris ve silier cismin inflamasyonu ile karakterize olup hastalarda %25-40 oranında görülür (Pang ve Davis, 2008). Üveit genellikle tek taraflı oluşur ve semptomları ağrı, kızarıklık, görme bulanıklığı, fotofobi ve artmış lakrimasyondur (Karataş, 2015; Sieper, 2002; Wolf, 2012), nadiren hipopiyon oluşumu gözlenebilir (Taş, 2013). En önemli komplikasyonu sineşidir (irisin skarlaşması ve küçülmesidir) (Kıbrıslı ve ark, 2015). AS'li hastalarda, akut anterior üveit tipik olarak akut ve dönüşümlü olarak meydana gelen atakların sık sık tekrarlanmasıyla karakterize olup her bir atak farklı zaman aralıklarında oluşur (Pang ve Davis, 2008).

Kardiyovasküler Tutulum:AS sürecinde kanın sol ventriküle geri kaçmasına neden olan aort regürjitasyonu, aortit (aort inflamasyonu), kardiyomiyopati (kalp kası hastalıkları) ve perikardit (perikat inflamasyonu) gibi kardiak bozukluklar görülebilir (Gündüz ve Erdal, 2014). AS'ye karakteristik bu bozukluklar, çoğunlukla HLA-B27 pozitif hastalarda ve uzun hastalık süreci sonunda meydana gelir (Pang ve Davis, 2008).

Pulmoner Tutulum: Semptom vermeyen akciğer tutulumu göğüs kafesi ve akciğer parankimini içermektedir (Pang ve Davis, 2008). Enflamasyondan kostovertebral ve kostotransdermal eklemler oldukça yaygın etkilenmektedir, bu da göğüs genişlemesinin ve akciğerlerin vital kapasitesinin azalmasına neden olur (Wolf, 2012). Az sayıda AS hastasında görülebilen apikal pulmoner fibroz, hastalık süresine bağlı olarak ortaya çıkar (Kıbrıslı ve ark,2015). AS hastalarında, normal insanlara göre, solunum nedenlerinden dolayı ölüm riski 3 kat daha fazladır (Zacharia ve Roy, 2019).

Gastrointestinal Tutulum: Bağırsak bulguları genellikle asemptomatiktir (Kıbrıslı ve ark, 2015). AS hastalarının %60'ında görülen semptom vermeyen bağırsak inflamasyonu ilerleyerek, AS'de %5-10 oranında görülen semptomatik inflamatuar bağırsak hastalığına evrilebilir (Pang ve Davis, 2008; Kıbrıslı ve ark, 2015).

Renal Tutulum: Ankilozan spondilitte böbrek tutulumu oldukça nadir görülmekle birlikte, uzun hastalık süresi olan bireyler otoimmün hastalığın bir parçası olarak sekonder bir renal amiloidoz geliştirebilir (Wolf, 2012). Ayrıca, AS'li hastalarda

nadir de olsa IgA nefropati ve hastalık modifiye edici anti-romatik ilaç tedavisi nedeniyle analjezik suiistimal nefropati de görülebilir (Pang ve Davis, 2008).

Nörolojik Tutulum: Omurgada instabilite, kırıklar, inflamasyon, posterior longitudinal ligament ossifikasyonu, disk lezyonları, spinal stenoz gibi nedenlerle basıya bağlı nörolojik komplikasyonlar olabilir (Kıbrıslı ve ark, 2015). Vertebra kırıkları; (1) Ankilozlu vertebranın C5-C6 ve C6-C7 seviyesindeki travmatik kırıklar ve (2) servikotorakal bölgede ve torakolomber bölgede oluşan stres kırıkları (spondilolizis) olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir (Pang ve Davis, 2008).

4.2.3. Tanı

Günümüzde AS tanısı, 1966 yılında geliştirilen ve 1984 yılında güncellenen Modifiye New York kriterleri (bkz, Tablo 1) tarafından tanımlanan bazı görüntüleme teknikleri ile klinik özelliklerin ve sakroileit kanıtların bir kombinasyonundan yapılır (Dakwar ve ark, 2008; Gündüz ve Erdal, 2014). Hasta en az bir radyolojik ve bir klinik kriteri karşılıyorsa *kesin AS* olarak, 3 klinik kriter gözleniyorsa ya da klinik kriterleri karşılayacak herhangi bir semptom olmaksızın radyolojik kriter sağlanıyorsa *muhtemel AS* olarak değerlendirilir (Dakwar ve ark, 2008; Moon ve Kim, 2014; Ranatunga ve Miller, 2014).

Tablo 1. Ankilozan Spondilit için Modifiye New York kriterleri (Moon ve Kim, 2014)

Klinik Kriterler	3 aydan uzun süre devam eden, egzersizle düzelen, ancak istirahatle geçmeyen bel ağrısı ve tutukluğu
	Sagital ve frontal düzlemlerde lumbar vertebranın hareketinin kısıtlılığı.
	Göğüs ekspansiyonunun yaş ve cinsiyetle bağlantılı olarak normal değerlerin altında olması
Radyolojik Kriter	≥2 derece çift taraflı sakroileit
	3-4 derece tek taraflı sakroileit

Sakroileitin radyografik kanıtı AS'nin karakteristik bir özelliğidir; primer AS'de genellikle bilateral ve simetriktir ve tipik olarak önce eklemin alt sinovyal kısmını tutar (Elyan ve Khan, 2008). Sakroileitin New York kriterlerine göre radyolojik olarak sınıflandırılması Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Radyografik sakroileitin derecelendirilmesi (Khmelinskii ve ark, 2018)

Derece	Tanım ya da radografik değişiklik
0	Normal
1	Şüpheli değişiklikler
2	Minimal anormallikler: eklem genişliğinde değişiklik olmaksızın erozyon ve sklerozlu küçük lokalize alanlar
3	*Kesin anormallik:* 1 veya daha fazla erozyon, skleroz, genişleme, eklem boşluğu daralması veya kısmi ankiloz belirtisi olan orta veya ileri düzeyde sakroileit
4	Şiddetli değişiklikler, tam ankiloz

Lumbar vertebranın hareket yeteneğinin ve göğüs ekspansiyonunun kısıtlılığı ve radyolojik olarak sakroileitin teşhis edilebilir duruma gelmesi hastalığın ilerleyen evrelerinde görüldüğü için Modifiye NewYork kriterleri erken teşhis için yeterli değildir (Akgül & Özgöçmen, 2011; Kabasakal, 2007).

Andiferansiye spondiloartropatileri de kapsaması amacıyla 1990-1991 yılında geliştirilip kullanılan AMOR (Spondiloartropatileri Teşhis Eden Çoklu Sınıflandırma Giriş Kriterleri) ve ESSG (Avrupa Spondiloartropati Çalışma Grubu) kriterleri, yüksek duyarlılığa (sırasıyla %85, %75) ve spesifiteye (sırasıyla %90, %87) sahip olduğu için spondiloartropati tanısında oldukça yararlı olsa da, şiddetli olmayan hastalık süreçlerinde ve hastalıkların ilk evrelerinde düşük duyarlılık (%68) gösterir (Gündüz ve Erdal, 2014; Şendur ve Aydeniz, 2001).

Önceki kriterlerden farklı olarak 2009 yılında tüm spondiloartropati grubunu aksiyal ve periferik SpA şeklinde ikiye ayıran ASAS (Assesment of SpondyloArthritis International Society) sınıflama kriterleri geliştirildi (Gündüz ve Erdal, 2014; Sudol-Suzopinska ve Urbanik, 2013).Periferik semptomları olan ya da olmayan, ağırlıklı olarak aksiyel tutulumu (bel ağrısı) olan hastalarda aksiyal SpA ASAS kriterleri uygulanır (Rudwaleit ve ark, 2011). 45 yaşından küçük olan ve 3 ay veya daha fazla süre bel ağrısı olan bir hastada radyolojik sakroileit ile birlikte bir veya daha fazla SpA bulgusu mevcutsa ya da hasta HLA-B27 (+) olup 2 veya daha fazla SpA özelliği gösteriyorsa hastaya aksiyal SpA tanısı konulabilir. Aksiyal SpA için ASAS sınıflandırma kriterleri Tablo 3'te verilmiştir.

Aksiyal şikayetleri olmayan, sadece artrit, entezit ya da daktilit özelliklerinden en az birine sahip olan ve tablo 4'te verilen grup 1'deki bulgulardan en az birini ya da grup

2’deki bulgulardan en az ikisini gösteren hastaya periferik SpA tanısı konulabilir. Periferik SpA için ASAS sınıflandırma kriterleri tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 3. Aksiyal SpA için ASAS sınıflandırma kriterleri (Poddubnyy, 2020)

Kronik bel ağrısı (≥3 ay) ve başlangıç yaşı <45

ve

Görüntülemede sakroileit

ve

≥1 SpA özelliği

ya da

HLA-B27 (+)

ve

≥2 diğer SpA özelliği

SpA Özellikleri

- İnflamatuar bel/sırt ağrısı(IBP)
- Artrit
- Üveit
- Daktilit
- Sedef Hastalığı
- Crohn/ülseratif kolit
- NSAİD’lere iyi cevap
- SpA için aile öyküsü
- HLA-B27
- Yüksek CRP

Tablo 4. Periferik SpA için ASAS sınıflandırma kriterleri (Poddubnyy, 2020)

Artrit ya da **entezit** ya da **daktilit**

ve

Grup 1 (≥1 SpA özelliği)		**Grup 2 (≥2 diğer SpA özelliği)**
Üveit	**veya**	Artrit
Psöriasis(sedef hastalığı)		Entezit
Crohn’s/ülseratif kolit		Daktilit
Öncül enfeksiyon		Inflamatuar bel ağrısı (geçmişte)
HLA-B27		Görüntülemede sakroileit
Görüntülemede sakroileit		SpA için pozitif aile öyküsü

4.2.4. Tedavisi

AS heterojen bir hastalık olduğu için multidisipliner bir tedavi gerektirmektedir (Elbey, 2015). AS hastalığına yönelik tedavilerin temel amacı, klinik semptomları gidermek, yapısal hasarları (özellikle omurgada meydana gelen deformiteyi) ve hastalığın ilerlemesini önlemek, hareket kabiliyetini, psikososyal durumunu ve böylece yaşam kalitesini korumaktır (Elbey, 2015; Kılıç ve Özgöçmen, 2014). Fakat, mevcut farmakolojik ya da farmakolojik olmayan tedavilerin hiçbiri hastalığın progresyonunu azaltacak ya da geriletecek özellikte değildir (Birlik ve Akkoç, 2007). AS'ye yönelik farmakolojik tedavi sınırlı sayıda olup, bu tedavinin temel taşı birinci basamak ilaç tedavisi olan NSAİD (non-steroidal anti-inflamatory drug)'lerdir. Fakat NSAID'ler hastalığın seyrini değiştirmeksizin sadece semptomatik etki gösterir: Enflamatuar semptomları etkili bir şekilde giderse de uzun vadede yapısal harabiyet devam etmekte ve kemik ankilozunun hareket yeteneğinde neden olduğu azalmayı gideremektedir (Evans ve ark, 2011; Sidiropoulos ve ark, 2008; Altan, 2005; Sieper ve ark, 2002). Ayrıca gastrointestinal sistemde rahatsızlıklara, böbrekte işlevsel bozukluklara da neden olabilir (Elbey, 2015).

NSAID'lere direnç gösteren semptomlar için kortikosteroidleri ve çeşitli hastalıkları modifiye eden anti-romatizmal ilaçları (DMARD) içeren ikinci basamak tedaviler kullanılır (Sieper ve ark, 2002). AS'nin tedavisindeki yeri tartışmalı olan DMARD'ların AS'de radyolojik ilerlemeyi engellediğini gösteren bir çalışma yoktur (Birlik ve Akkoç, 2007). DMARD'lar, sadece aksiyal bulguları olan hastalarda yararlı olmazken, periferal bulgular üzerinde etkili olabilir (Elbey, 2015).

NSAID ve DMARD tedavisine rağmen hastalık hala aktif ise, anti-TNFa ilaçları kullanılır (Kıbrıslı ve ark, 2015). Çünkü, inflamasyona ve eklem harabiyetine neden olan TNFa gibi inflamatuar sitokinler engellendiğinde hastalık progresyonunun yavaşlatılabileceği düşünülmektedir (Birlik ve Akkoç, 2007). Fakat NSAID'e dirençli hastalarda TNF blokajı, semptomatik rahatlama olsa bile kemik erozyonunu önleyememektedir (Tam ve ark, 2010).

4.2.5. Etiyoloji ve Patogenezi

AS'nin nedeni ve mekanizması kesin olarak bilinmese de, günümüze kadar yapılan çalışmalar, çoğu otoimmün/otoinflamatuar hastalık gibi çok faktörlü olduğunu ve AS'nin oluşumunda genetik yapı, immünreaksiyon ve hormonal anormallik gibi bazı etkenlerin rol oynayabileceğini göstermiştir (Zhu ve ark, 2019; Simone ve ark, 2018; Watad ve ark, 2018).

4.2.5.1. İmmünolojik, mikrobiyal ve hormonal faktörler

Literatürde kesin bir fikir birliği olmamakla birlikte, hakim olan görüşe göre, erkeklerin AS olma olasılığı kadınlara göre 2 ila 3 kat daha fazla olup coğrafi yerleşime de bağlı olarak AS popülasyonunun %65-80'ini erkekler oluşturmaktadır (Sieper ve ark, 2002). Erkekler daha şiddetli semptomlara sahip olma eğilimindedir (Haroon ve ark, 2018). Bazı çalışmalar ayrıca, kadınların tanıda daha uzun bir gecikme, servikal omurga ve periferik eklemlerde daha fazla ağrı, daha az torasik ve lomber spinal radyografik şiddet, daha düşük Bath Ankilozan Spondilit Radyoloji İndeksi skorları ve aynı radyografik hasar seviyesinde daha fazla fonksiyonel kısıtlamaya sahip olduğunu göstermektedir (Chen ve ark, 2011). Cinsiyete göre verilen immün tepkinin, gen ekspresyonunun ve eşeysel hormonların değişmesi nedeniyle AS'nin cinsiyete göre farklılık göstermesine neden olabileceği öne sürülmüştür (Rusman ve ark, 2018; Zhu ve ark,2019).

Hastalığın seyrinde farklılık gösteren diğer bir özellik başlangıç yaşıdır. AS, tipik olarak 40 yaşından küçük kişilerde teşhis edilmekte ve hastaların yaklaşık %80'i ilk semptomların 30 yaşından küçükken göstermektedir (Wenker ve Quint, 2022). AS %5 hastada 45 yaşın üzerinde ortaya çıkmaktadır (Wenker ve Quint, 2022).

Birçok çalışma hem dendritik hücreler, makrofajlar, doğal katil hücreler gibi doğuştan gelen immün hücrelerin, hem yardımcı T, Treg, CD8+T hücreleri gibi adaptif (kazanılmış) immün hücrelerin salgıladıkları sitokinler ve moleküller aracılığıyla AS patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Liao ve ark, 2022; Rezaiemanesh ve ark, 2018).

HLA-B27(+) transgenik sıçanlarının mikroorganizmasız ortamda SpA özelliklerini geliştirmemesi, bu durumun sıçanlara kommensal bakteriler eklendiğinde değişmesi,

AS hastalarının bağırsak mikrobiyomlarının sağlıklı kontrollere kıyasla önemli farklılıklar göstermesi mikrobiyal enfeksiyonun AS gelişimini tetikleyici bir faktör olarak hareket ettiğini düşündürmektedir (Zhu ve ark, 2019).

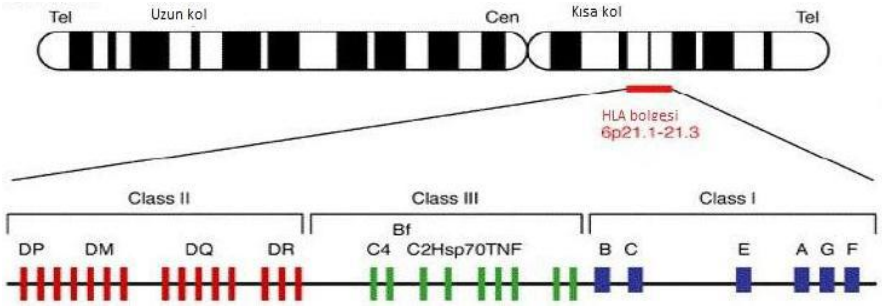
Özetle, AS'nin patogenezi bilinmese de, inflamasyonun tetikleyicisinin, yatkın bir genetik geçmişi olan bir kişide çevresel ya da bakteriyel bir antijene karşı gelişen immün tepkinin ve bunun sonucunda tetiklenen IL-12, IL17 ve TNFα'nın aşırı ekspresyonu olduğu düşünülmektedir (Ebrahimiadib ve ark, 2021).

4.2.5.2. AS'nin Genetiği

1961'den beri AS ile genetik faktörler arasında önemli bir korelasyon olduğu ve AS riskine %90 oranında genetik yapının neden olduğu düşünülmektedir (Brown, 2018). Geniş çaplı ikiz çalışmalarına göre, monozigotik ikizler arasındaki AS konkordansı (%63) dizigotik ikizlere (%23) göre anlamlı derecede daha yüksektir (Zhu ve ark, 2019; Öztürk ve ark, 2021). AS hastalarının birinci derece akrabalarında risk artmaktadır (Wenker ve Quint, 2022). Genetik yapı, ayrıca, hastalığın seyrini ve başlama yaşını da belirlemektedir (Karataş, 2015).

4.2.5.2.1. MHC Genetiği ve AS ilişkisi

Altıncı kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan 70'den fazla genden oluşan 4000 kb büyüklüğündeki bölge Ana Doku Uyumluluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex, MHC) olarak adlandırılır (Wieczorek ve ark, 2017). Bu bölgedeki genler, organizmanın kendisine ait olan ve olmayan molekülleri tanımasını sağlayan ve hücre zarında bulunan glikoprotein yapılı kazanılmış immün sistem antijenlerini kodlar. Bu antijenler, yabancı molekülleri immün tepkinin oluşması için bağışıklık sistemine ait efektör hücrelere sunar (Wieczorek ve ark, 2017). Bu nedenle, MHC antijenleri, mikrobiyolojik invazyonla savaşmada, malign hücre proliferasyonunu kontrol etmede ve transplantasyon başarısında hayati öneme sahiptir (Reveille ve Brown, 2008). İlk kez insan lökositlerinin üzerinde tanımlandıkları için **İnsan Lökosit Antijenleri (HLA)** olarak da adlandırılır ve şekil 3'deki gibi bulundukları hücrelerin çeşidine ve immün fonksiyonuna göre farklılık gösteren 3 alt grubu vardır: Sınıf I, II ve III (Öztürk, 2011).



Şekil 3. MHC sınıf I, II ve III bölgelerinin yerleşimi (Narinder ve Mehra, 2003'den alınma)

MHC Sınıf I bölgesi; tüm çekirdekli insan hücreleri ve trombositlerde bulunur ve HLA A, HLA B ve HLA C gibi klasik transplantasyon antijenlerini kodlar (Sarıkaya Pekacar, 2015; Zhu ve ark, 2019). Bu antijenler, endojen proteinlerin yıkımı sonucu oluşan peptitleri sitotoksik T lenfositlerinin yüzeyindeki T hücre reseptörlerine (TCR) sunar (Çankaya, 2014; Zhu ve ark, 2019). Ayrıca, HLA alellerinin romatolojik hastalıklarla asosiasyon gösterdiği de bilinmektedir.MHC sınıf I aleli olan HLA-B27, belirsiz patomekanizmasına rağmen AS hastalığına yatkınlık kazandıran temel faktör olarak kabul edilmektedir (Ebrahimiadib ve ark, 2021).

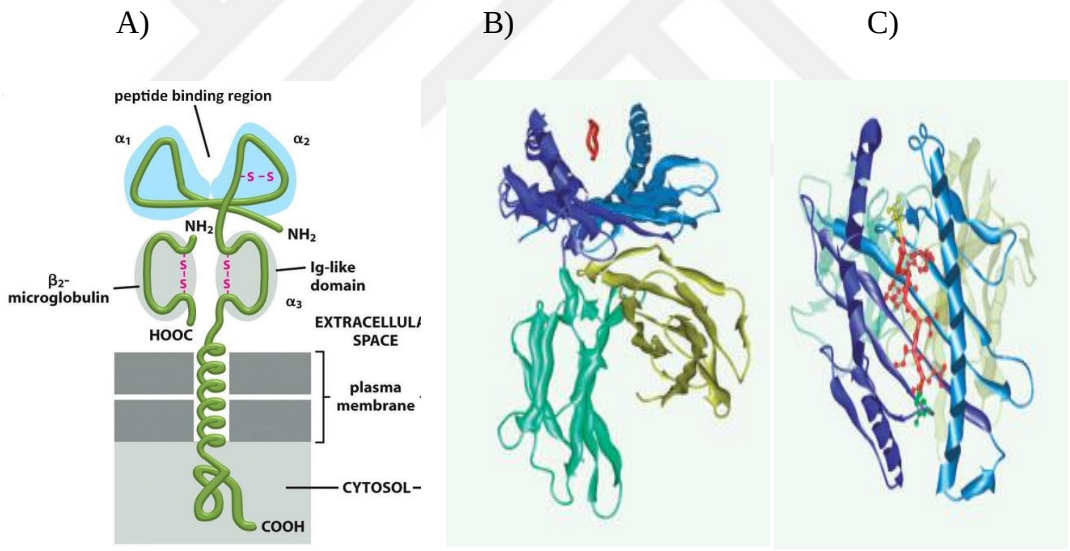
4.2.5.2.1.1. HLA-B27'nin yapısı ve fonksiyonu

HLA-B27, şekil 4'te gösterildiği gibi 12kD'lik monomorfik bir hafif zincir (beta2mikroglobulin, b2m) ve b2m ile kovalent olmayan şekilde kompleks haline getirilmiş 45Kd'lik polimorfik bir ağır zincirden (a) oluşan heterodimerlerdir (Dakwar ve ark, 2008). Sadece ağır zincir MHC bölgesindeki genler tarafından kodlanmaktadır (Öztürk, 2011). Ağır zincir, üç domainden (a1, a2 ve a3) oluşur. a1 domaini b2m molekülü ile kovalent olmayan bir şekilde bağlanırken, a3 plazma zarını kaplar ve T hücrelerinin CD8 koreseptörü ile etkileşime girer (Yewdell, 2011). MHC sınıf I kompleksi, a1 ve a2 arasında oluşan yarık ile 8-10 amino asit uzunluğundaki peptitlere bağlanır ve böylece bağışıklık tepkilerinin başlatılmasına ve yayılmasına yol açar (Yewdell, 2011).

Yüksek derecede polimorfizme sahip HLA-B27'nin bugüne kadar 132 alel tarafından kodlanan 105 alt tipi tanımlanmıştır (Ebrahimiadib ve ark, 2021). Bu alt tipler, a1 ve a2 domainlerini kodlayan ekson 2 ve 3'teki değişiklikler nedeniyle bir veya daha fazla aminoasitin yer değiştirmesi sonucu oluşur (Wieczorek ve ark, 2017). En yaygın alt tipleri B*2705 ve B*2704'tür (Karataş, 2015). HLA alellerinin

çeşitliliğindeki bu fazlalık, otoimmün hastalıklara yatkınlığın oluşmasını ya da bu hastalıklara direnç geliştirmeyi sağlamakta, böylece hastalık fenotipinde varyasyonlara neden olmaktadır.

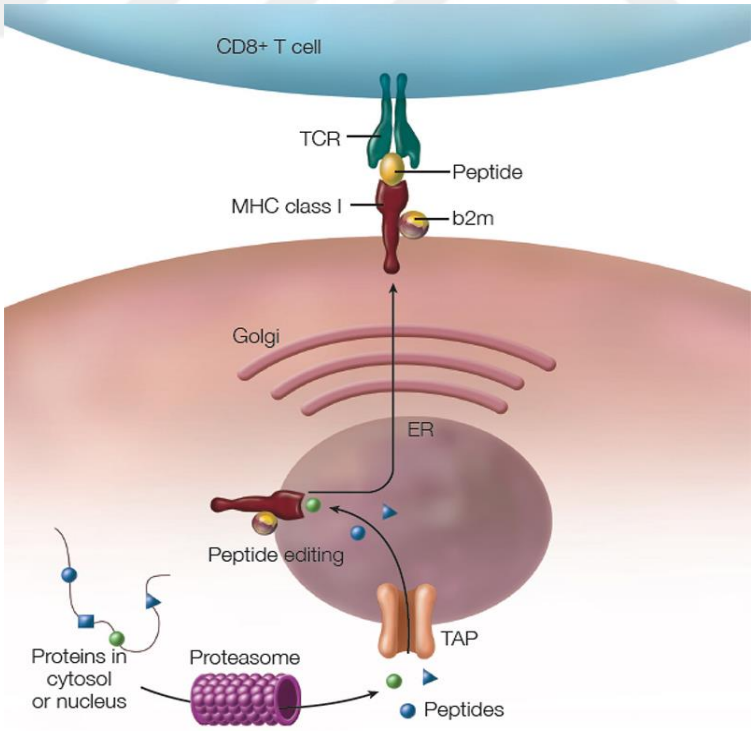
Literatüre göre, AS hastalarının %90-95'i HLA-B27 (+)'dir ve HLA-B27 (+) olan kişilerde AS prevalansı %5 ila %6 olup bu risk, etkilenen hastaların birinci derece akrabalarında %15-20'ye kadar artmaktadır (Wenker ve Quint, 2022). HLA-B27 (+) AS hastaları, bu aleli taşımayan AS hastalarına göre daha düşük bir başlangıç yaşı ve daha yüksek akut ön üveit prevalansı göstermektedir (Zhu ve ark, 2019). Fakat, HLA-B27'nin alt tiplerinin AS'ye duyarlılıkla korelasyonu değişmektdir (Ebrahimiadib ve ark, 2021). HLA-B27'nin bildirilen alt tiplerinden B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2707, B*2708 ve B*2710'un çeşitli populasyonlarda ve etnik kökenlerde AS riskini önemli ölçüde arttırdığı rapor edilirken, B*2706 ve B*2709 hastalıkla ilişkili değildir (Brown, 2018; Simone ve ark, 2018).



Şekil 4. HLA-B27 molekülünün hücre içi ve hücre dışı kısımlarının şematik gösterimi A) Ağır zincir, heterotrimerik bir kompleks oluşturmak üzere, b2mikroglobulin ve peptit ile kovalent olmayan bir şekilde bağlanır. B ve C) HLA-B27'nin hücre dışı kısmının kristal yapısı B) Peptit bağlı HLA-B27 yapısının şerit modeli (yandan görünüm) C) Peptit bağlama oluğunun üstten görünüşü. Peptit, iki a-helis ve sekiz anti-paralel b tabakasından oluşan peptit bağlama oluğu içinde oturur. N ve C terminallerindeki amino asit kalıntıları gösterilmiştir (sırasıyla sarı ve yeşil). Glikosilasyon bölgeleri gösterilmemiştir. (McHugh ve Bowness, 2012'den alınma)

Ağır zincir transkripsiyon sonrası translasyon ile lineer olarak sentezlenir ve endoplazmik retikulum (ER)'ye taşınır. ER'de şaperonların yardımıyla b2m'ye bağlanır (Tam ve ark, 2010). Sitozolde endojen proteinlerin ve hücreleri istila eden virüs ve bakterilerin proteinleri proteazomlar ile 4-20 aa uzunluğunda antijenik

peptitler haline getirilir (Dakwar ve ark, 2008; Tam ve ark, 2010) ve heterodimerik TAP kompleksi aracılığıyla ER'ye taşınır (Lodish ve ark, 2011). Uzun olan antijenik peptitler, HLA-B27'ye bağlanması için ER'de bulunan aminopeptidazlar (ERAP1) tarafından antijen sunumu için gerekli optimal uzunluk olan 8-9 aminoasitlik oligopeptitlere kadar kesilir ve ağır zincir-b2m kompleksi ile birleşir (Chen ve ark, 2017). Daha sonra ağır zincir-b2m-peptit kompleksi üç boyutlu bir yapıya katlanır (Tam ve ark, 2010) ve olgun epitopların üretimi için Golgi aygıtına girer (Chen ve ark, 2017) ve Golgi aracılığıyla hücre yüzeyine taşınır (Dakwar ve ark, 2008). Burada HLA-B27, antijenik peptitleri sitotoksik (CD8+) T lenfositlerine ya da doğal katil hücrelerine sunar (Antoniou ve ark, 2011). MHC-peptit kompleksinin antijene özgü bir T lenfositin T hücre reseptörü tarafından tanınması antijen sunumunu tamamlar (Dakwar ve ark, 2008). T hücre reseptörü MHC-peptit kompleksini tanırken, T hücresinin CD8+ molekülü de HLA sınıf I antijeninin peptit bağlama bölgesi dışındaki yerine bağlanmaktadır (Etiz, 2009). Bu tanıma ve bağlanma sonucu, CD8+ T lenfositi hedef hücreyi lizise uğratmaktadır (Etiz, 2009). MHC Sınıf-I antijen sunum yolağı şekil 5'te özetlenmiştir.



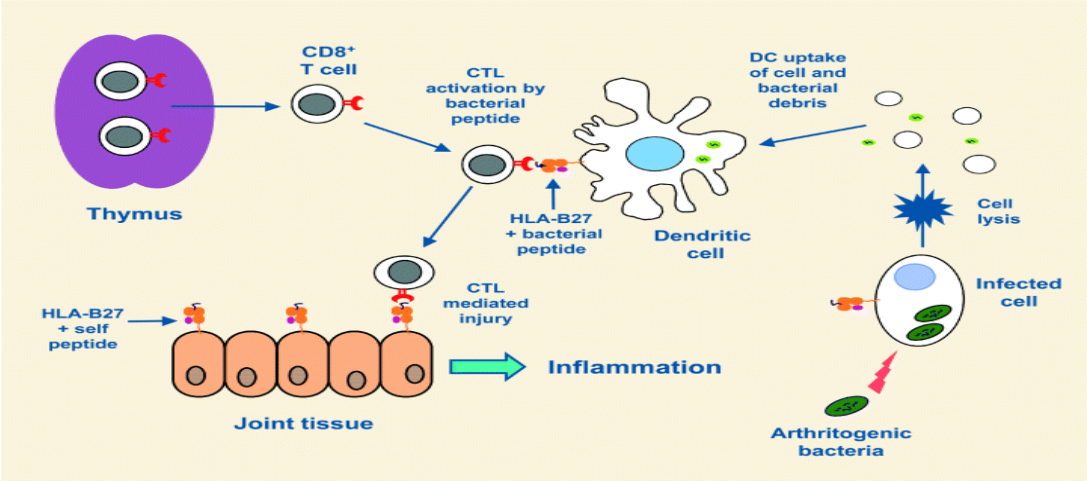
Şekil 5. MHC Sınıf I Antijen Sunum Yolağı (TCR:T hücresi reseptörü, b2m: beta2mikroglobulin, ER: Endoplazmik retikulum, TAP:Antijen sunumu ile ilişkili taşıyıcı) (www.the-rheumatologist.org, 10 Eylül 2022)

4.2.5.2.1.2. HLA-B27'nin AS patogenezindeki rolüne ilişkin hipotezler

HLA-B27'nin AS yatkınlığa nasıl katkıda bulunduğunu açıklamaya çalışan çeşitli teoriler bulunmaktadır. Bu teorilere göre, AS'nin başlangıcı aberrant (anormal) peptit sunumundan, yanlış katlanmış HLA-B27 moleküllerinden, HLA-B27 dimerlerinden veya b_2m birikiminden kaynaklanıyor olabilir (Chen ve ark, 2017). Bu teoriler aşağıda özetlenmiştir.

Artritojenik Peptit Hipotezi: Bu hipotez HLA-B27'nin peptit bağlama özelliğine, moleküler mimikri kavramına ve bir eksternal antijen tarafından aktive edilen T hücresi tepkisinin otoimmünite ile sonuçlanabileceği fikrine dayanır. Bu hipoteze göre, enterik bakterilerin enfeksiyonu sonrası gelişen CTL (sitotoksik T lenfositi) tepkileri HLA-B27'yi aktive eder (Sharip ve Kunz, 2020). HLA-B27'nin hastalıkla ilişkili tüm alt tipleri bu patojen bakterilere ait peptide moleküler olarak benzeyen ve eklemlerde bulunan self-peptiti kendilerine bağlayarak CD8+T hücrelerine sunar (Reveille ve Brown, 2008; Reveille, 2012; Robinson ve Brown, 2012). Bağışıklık sistemine sunulan bu peptit, moleküler benzerlik nedeniyle zararlı ya da yabancı olarak algılanır ve aktive edilmiş CTL'ler, bu self-peptit ile çapraz reaksiyona girer (Kenna ve ark, 2015). Bu durum, kendine toleransın bozulmasına, eklemlerde ve diğer etkilenmiş dokularda doku hasarının başlatılmasına ve yaygın inflamasyona neden olur (Schittenhelm ve ark, 2015; Shamjı ve ark, 2008). Artritojenik peptit hipotezi şekil 6'da şematize edilmiştir.

AS ile ilişkili olmayan HLA-B27 alt tipleri, peptide bağlanma oluklarındaki aminoasit değişiklikleri nedeniyle, AS ile ilişkili HLA-B27 alt tiplerinden farklı peptit repertuarını sunar (Kenna ve ark, 2015; McHugh ve Bowness, 2012; Schittenhelm ve ark, 2015; Shamjı ve ark, 2008). Bu durum, artritojenik peptit hipotezini destekler niteliktedir. Bu hipotez HLA-B27'nin antijen sunum fonksiyonu ile tutarlıdır, fakat sayısız çalışmalara rağmen böyle bir peptit henüz keşfedilmemiştir (Reveille, 2012; Robinson ve Brown, 2012). Ayrıca HLA-B27(+) transgenik sıçan modelinde, CD8+ T hücrelerinin yokluğunda bile hastalık görülür (Simone ve ark, 2018).



Şekil 6. AS patogenezinde artritojenik peptid hipotezi (Ramos ve Castro, 2002'den alınma)

Yanlış Katlanmış HLA-B27 Hipotezi: HLA-B27'nin AS'ye nasıl yol açabileceğine yönelik mevcut bir diğer mekanizma, HLA-B27 ağır zincirlerinin ER'de yanlış katlanmasına dayanmaktadır. ER protein yanlış katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin doğasına, miktarına ve ayrıca kusurun ciddiyetine bağlı olarak çeşitli biyolojik etkilere sahiptir (Sharip ve Kunz, 2020).

HLA-B27 molekülünün ağır zinciri, diğer HLA proteinlerinden farklı olarak çok daha yavaş katlanma oranına sahiptir (Dakwar ve ark, 2008; Sharip ve Kunz, 2020). HLA-B27'nin yavaş katlanması, peptit bağlama oluğunun B cebinin bir parçasını oluşturan almış yedinci aminoasit pozisyonundaki eşlenmemiş sisteinler arasında anormal disülfür bağlarının oluşmasına neden olur (Antoniou ve ark, 2011; Dangoria ve ark, 2002). Anormal disülfür bağ oluşumunun bir sonucu olarak yanlış katlanan HLA-B27 ağır zincirleri endoplazmik retikulumda (ER) birikmeye başlar ve ER stresine neden olur. ER stresi, hücrenin yanlış katlanmış proteinleri temizlemeye ve ER ortamını normale döndürmeye başladığı homeostatik bir mekanizma olan *Katlanmamış Protein Tepkisini* (UPR) tetikler (Robinson ve Brown, 2012). UPR; NF-$_K$B'nın aktivasyonu ile başlar. Aktive olan NF-$_K$B çekirdeğe girer ve TNFα, interlökin ve kemokin gibi sitokinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu uyarır (Dakwar ve ark, 2008). Bu da, eklemlerde inflamatuvar reaksiyona yol açan IL-23, TNFa, IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmasına neden olur (Sharp ve Kunz, 2020; Delay ve ark, 2009).

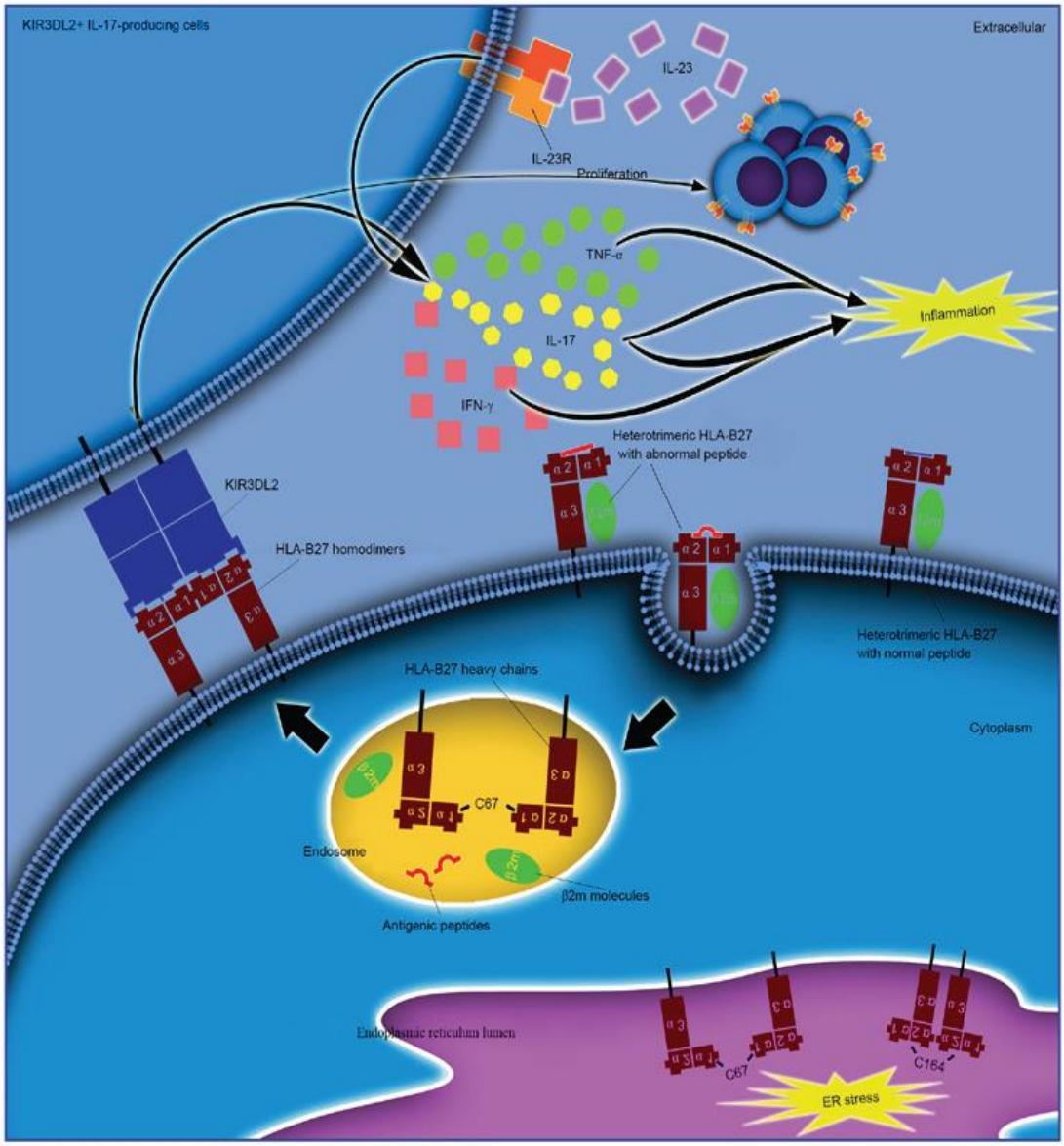
Öte yandan, HLA-B27'de bir anormallik olmamasına rağmen, ERAP-1 eksikliği ya da mutasyonu ER içindeki uzun peptitlerin N terminalinin anormal kırpılmasına ve böylece normalden daha uzun ya da normalden daha kısa anormal peptitlerin oluşmasına neden olabilir (Kenna ve ark, 2015). Antijenisitesi değişen ve yüksek düzeyde immünojenik olabilen bu anormal peptitlere HLA-B27'nin bağlanması sonucu kararsız ve yapısal olarak benzersiz anormal MHC-peptit kompleksi oluşabilir (Chen ve ark, 2017). Bu kompleksler AS sürecini farklı şekillerde etkileyebilir: Anormal HLA-B27-peptit moleküllerinin sunumu sonucu güçlü anormal CD8+T hücre tepkisi ortaya çıkabilir (Kenna ve ark, 2015). Ayrıca, kararsız anormal peptitler MHC-peptit kompleksinin yavaş katlanmasına neden olur. Altmış yedinci aminoasit pozisyonundaki sisteinler arasında oluşacak disülfür bağları sonucu kompleks yanlış katlanır ve kusurlu HLA-B27-peptit molekülü ER'de birikir. ER stresine ve UPR aktivasyonuna neden olur. Bu durum, IL-23 ve IL17 yapımının artışına ve böylece immün tepkinin oluşmasına yol açar.

Özetle bu teoriye göre; ER'de HLA-B27 ağır zincir birikmesi, ER stres yolaklarının hastalık patogenezine katkıda bulunan proinflamatuar sitokinleri salgılamasını sağlayan güçlü ve kronik uyarım oluşturmaktadır (McHugh ve Bowness, 2012).

HLA-B27'nin makrofajlarda yanlış katlanarak IL-23'ün upregülasyonuna yol açtığı transgenik HLA-B27(+) sıçan modelinde gözlenmiştir (Simone ve ark, 2018). Bununla birlikte, AS hastalarında bağırsak biyopsileri üzerine yapılan çalışmalar UPR gen transkripsiyonunun uyarılmasına dair bir kanıt göstermeyip, otofaji varlığına işaret etmektedir (Simone ve ark, 2018).

Hücre yüzeyi HLA-27 Homodimer Hipotezi: AS'nin gelişiminin altında yatan mekanizmaya dair ileri sürülen "hücre yüzeyi HLA-B27 homodimerleri" hipotezi, HLA-B27 ağır zincirlerinin homodimerler oluşturmalarına neden olan ekstrasellüler a1 domainindeki Cys67 kalıntısının varlığına dayanmaktadır (Reveille, 2012). HLA-B27 ağır zincirleri hidrojen bağıyla b2m ve peptitlere düşük bağlanma afinitesi gösterirken, iki ayrı ağır zincir molekülü b2m'nin katılımı olmaksızın peptit bağlama oluğundaki Cys67'ler arasında disülfür bağlarının oluşumu sonucu (Chen ve ark, 2016) bozulmaya karşı daha az duyarlı (Antoniou ve ark, 2011) kovalent homodimerler oluşturabilir. Bu homodimerlerin, şekil 7'de gösterildiği gibi, stabil

olmayan tamamen katlanmış HLA-B27-peptit komplekslerinin hücre yüzeyi üzerinde ayrışmasıyla (endositik yolla geri dönüşümünü takiben) meydana geldiği düşünülmektedir (Chen ve ark, 2017; Bowness ve ark, 2011). Ayrıca, HLA-B27 ağır zincirleri ERAP1 eksikliği ya da mutasyonu sonucu oluşan anormal peptitlere bağlanmayıp ER içerisinde birikebilir (Chen ve ark, 2017). Biriken ağır zincirlerin cys67'leri arasında kurulabilecek disülfür bağları sonucu kararlı kovalent HLA-B27 homodimerleri oluşabilir. Bu homodimerler, klasik HLA-B27'den farklı olarak, anormal bağışıklık tepkilerine yol açan NK ve CD4(+) T hücreleri tarafından ekspre edilen immünoreseptör KIR3DL2'ye (katil hücre immünoglobulin benzeri reseptörü) bağlanır (Bowness ve ark, 2011). KIR3DL2 reseptörü, hücre yüzeyi HLA-B27 homodimerlerini klasik HLA-B27 heterotrimerlerine göre daha büyük bir affinite ile bağlayabilir (Zhu ve ark., 2019).Bu bağlanma, inflamatuar CD4+T lökositlerinin sağ kalımını ve farklılaşmasını uyarır (Zhu ve ark, 2019): KIR3DL2 üreten proinflamatuar CD4(+) T hücrelerinin uyarılması üzerine bu hücreler prolifere olur ve yüksek seviyelerde IL-17 üreten Th17 hücrelerine doğru polarize olur (Simone ve ark, 2018). IL-17 ise, çeşitli proinlamatuar sitokinler, kemokinler ve prostanoidlerin sekresyonunu indüklemek için çeşitli hücre tipleri üzerine etki eder (Jovanovic ve ark, 1998). Ayrıca, KIR3DL2 reseptörünün uyarılması sonucu IL-17'nin yanı sıra TNFa ve IFNg gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi de artar (Sharp ve Kunz, 2020). Öte yandan, HLA-B27 molekülünün ayrışması sonucu β_2m birikerek, doku yıkımında rol oynayan proteinlerin sentezini ve sekresyonunu indükleyebilir (Chen ve ark, 2017).



Şekil 7. ER'ye yerleşik ve hücre yüzeyi HLA-B27 dimerlerinin farklı patojenik rolleri (Chen ve ark, 2017'den alınma).

4.2.5.2.2. MHC dışı genlerin AS ile ilişkisi

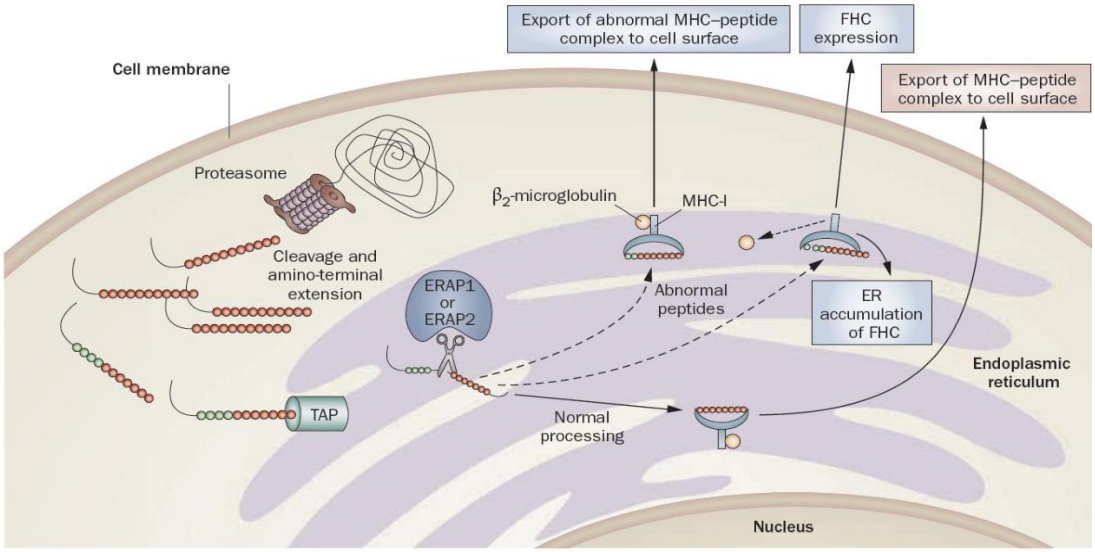
HLA-B27'nin AS'ye nasıl yol açabileceğine yönelik ileri sürülen tüm teorilerin/mekanizmaların AS etyopatogenezinde rol oynaması muhtemeldir. Fakat AS'li hastaların çoğunluğu HLA-B27(+) olsa da, bu sadece hastalığın %90 olarak tahmin edilen heritabilitesinin %30'unu oluşturur (Simone ve ark, 2018). AS hastalarının yaklaşık %15-20'si HLA-B27(-) olması ve HLA-B27(+) bireylerin çoğunluğunun SpA geliştirmemesinden dolayı bu mekanizmalar AS'ye duyarlılığı tam olarak açıklamamaktadır (Reveille, 2012; Brown, 2018). Bu durum HLA-B27 taşıyıcılarında hastalık riskini etkileyen ve HLA-B27(-) bireylerde hastalığın ortaya

çıkması için HLA-B27 dışında ilave risk faktörlerinin olması gerektiğini gösterir (Brown, 2018). Avrupa kökenli kohortlarda yapılan 2007, 2010 ve 2011 *Genome-wide association studies* (GWAS) ve Latin kökenli kohortta 2013 ve 2016 yıllarında yapılan vaka-kontrol AS ilişkilendirme gibi genom ve ekzom çalışmaları sonucunda tanımlanan bazı MHC dışı lokusların hastalığın predispozisyonunda ve fenotipinde etkili olduğu saptanmıştır (Li ve Brown, 2017; Reveille ve ark, 2010; Cortes ve ark, 2013; Ellinghaus ve ark, 2016; Burton ve ark, 2007, Evans ve ark, 2011; Robinson ve ark, 2016). ERAP1, IL-23R, RUNX3, CARD9, PTGER4, IL-1R2, kodlanmamış 2 tane gen (2p15 - 21q22) sekansı ve ANTXR2 bunlardan bazılarıdır (Li ve Brown, 2017).

4.2.5.2.2.1. Endoplazmik retikulum aminopeptidaz-1 (ERAP-1)

Kromozom 5q15'te lokalize ERAP1 geni HLA-B27'den sonra AS ile yakından ilişkili olduğu gösterilen en önemli ikinci gendir (Su ve ark, 2018). ER'de bulunan çinko metallopeptidazların bir üyesi olan ERAP1 proteini, ER'deki peptitlerin HLA-B27 gibi MHC sınıf –I molekülleri üzerine bağlanmasından önce veya sonra bu peptitlerin son proteolitik işleminde rol oynamaktadır (Su ve ark, 2018; Brown, 2018): MHC Sınıf I allomorflarının çoğu, antijen sunumu için stabil (kararlı) birleşimleri 8-10 aa uzunluğunda olan peptitleri gerektirir (Yan ve ark, 2006). ERAP1 gen ürünün primer işlevi de, proteozomlar ya da diğer sitozolik protezlar tarafından üretilen 25 aa uzunluğundaki prekürsör peptitlerin HLA-B27 gibi HLA-I molekülleri tarafından yüklenmesi ve sunulması için, onları ER proteozomları içerisinde 9 aminoasitlik ideal boyutuna kırpmaktır (Yan ve ark, 2006; Reveille, 2012). Bu nedenle ERAP1 varyantları sunulan peptitlerin moleküler ağırlığını, uzunluğunu ve miktarını değiştirir (Ruyssen-Witrand ve ark, 2019). Sunulan peptit repertuarındaki değişiklik bağışıklık işlev bozukluğunun arkasındaki itici güç olabilir (Kenna ve ark, 2015). ERAP1 eksikliği ya da mutasyonu sonucu oluşan çok sayıdaki uzun veya anormal peptitlerin varlığı güçlü CD8+ T hücresi ve B hücresi tepkilerini ortaya çıkarabilir (Chen ve ark, 2017). Bu da daha büyük bir AS insidansına yol açabilir (Chen ve ark, 2017). Fakat AS ile ERAP1 ilişkisi HLA-B27 pozitif vakalar ile sınırlıdır (Brown, 2018; Zhu ve ark, 2019). Gen-gen etkileşiminin bir örneğini temsil eden bu bulgu, AS'nin poligenik bir hastalık olduğunu, ERAP varyantlarının

HLA sınıf I alelleri ile yakın çalıştığını göstermektedir (Brown, 2018). İki gen arasındaki etkileşim, anormal peptit işleme ve yanlış antijen sunumunun AS patogenezine önemli katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Sharip ve Kunz, 2020). HLA-B27 ile epistatik etkileşim içinde olan ERAP 1 işlev kaybı mutasyonları ve polimorfizmleri, *HLA-B27* ağır zincir ekspresyonunu, dimerizasyonunu veya katlanmasını etkiler (Tam ve ark, 2010; Reveille, 2012; Watad ve ark, 2018), HLA-B27'nin peptitler ile etkileşimi değişir (Simone ve ark, 2018). ERAP 1'in antijen işleme ve sunumundaki etkisi şekil 8'de özetlenmiştir. Antijen sunumundaki rolünün yanı sıra ERAP1, hücre yüzeyi üzerinde ekspre edilen TNFR1, IL6R2 ve IL1R2 gibi sitokin reseptörlerini hücre yüzeyinden ayırır (Kenna ve ark, 2015). Böylece hücresel immün tepkileri regüle eder, proinflamatuvar sitokin sinyalini önler (Sharip ve Kunz, 2020).



Şekil 8. Antijen işleme ve sunumunda endoplazmik retikulum aminopeptidazlarının rolünü gösteren şematik diyagram (Haroon, 2012'den alınma).

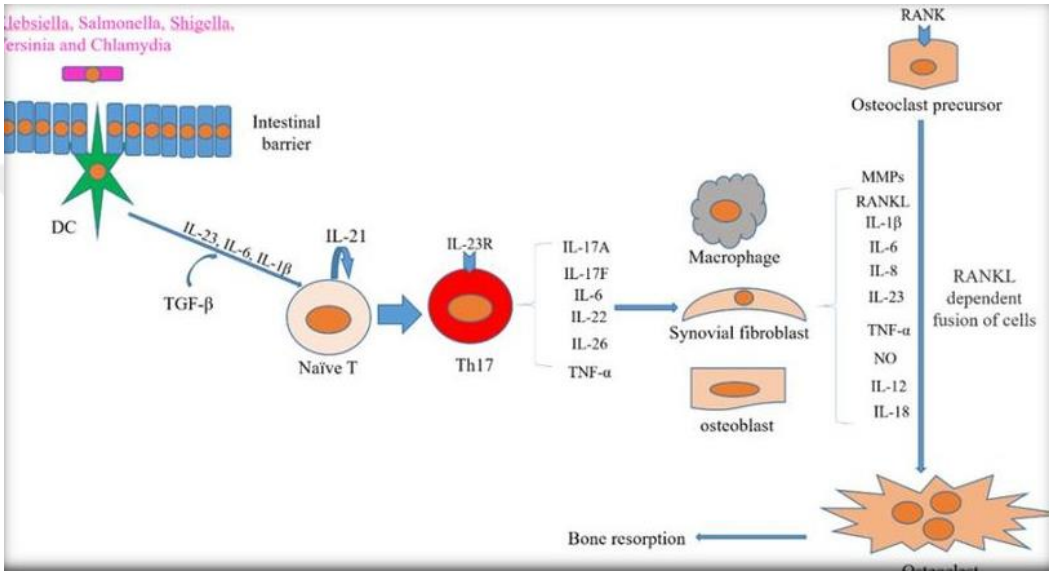
4.2.5.2.2.2.İnterlökin-23 reseptör (IL-23R)

IL23; kromozom 12q13.2'de bulunan genler tarafından kodlanan p19 alt birimi ve kromozom 11q1.3'te bulunan genler tarafından kodlanan IL12 ile ortak p40 alt biriminden oluşan IL12 sitokin ailesinin bir üyesidir (Jetwa ve Bowness, 2016). Deri, bağırsak mukozası, eklemler ve akciğerler gibi periferik dokularda bulunan ve antijen ile stimüle edilen (uyarılan) makrofajlar ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreler tarafından salgılanır (Daryabor ve ark, 2018; Schinocca ve ark, 2021). IL23, ana rolü naif CD4+ T (Th_0) hücrelerinin güçlü inflamatuvar tepkileri tetikleyen

IL17, IL17F, IL6 ve TNFα üreten ve yüksek derecede patojenik olan yardımcı T hücrelerine (Th17) farklılaşmasını indüklemek olan proinflamatuvar bir sitokindir (Costantino ve ark, 2018; Simone ve ark, 2018). Ayrıca, IL-1, IL-6 ve TNFa gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılamaları için otokrin/parakrin bir şekilde dendritik hücreler ve makrofajlar üzerine de etki eder (Iwakura ve Ishigame, 2006). IL23/IL17 yolağı aracılığıyla bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli bir rol oynarken, bu yolaktaki bir bozukluk kronik inflamasyonun ve otoimmünitenin gelişmesine katkıda bulunur (Iwakura ve Ishigame, 2006; Zhu ve ark, 2019; Schinocca ve ark, 2021).

IL-23 sitokinine ait Interlökin 23 reseptörü (IL-23R), IL12R ile ortak olan IL12Rβ1 ve IL-23 sinyallemesine spesifik olan IL23Rα olmak üzere iki alt birimden oluşan heterodimerik bir reseptördür (Schinocca ve ark, 2021). IL-23 reseptörü (IL-23R); monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler üzerinde düşük seviyelerde ve esas olarak, aktive edilmiş bellek T hücreleri, T hücresi klonları ve NK hücreler üzerinde ekspre edilir (McHugh ve Bowness, 2012). Th_0 hücreleri IL23R'yi yapısal olarak ekspre etmese de, TGFβ, IL-6 varlığında Th_0'ın ilk farklılaşmasını destekleyerek bu hücreleri IL-23'e duyarlı hale getirmektedir (Schinocca ve ark, 2021). IL23R sinyalinin oluşturulması, *signal transducer and transcription activator 3* (STAT3) ve *Tyrosine kinase 2* (Tyk2) gibi bir dizi hücre içi proteini gerektirir (Jetwa ve Bowness, 2016; Simone ve ark, 2018). IL-23'ün reseptörüne bağlanması, Jak2 ve Tyk2 aktivasyonuna yol açar. Aktive olan Jak2 ve Tyk2, IL-23R'nin farklı bölgelerini fosforile ederek STAT'lar için bağlanma/tutunma yerleri oluşturur (Safrany ve ark, 2009). STAT'lar daha sonra Jaklar tarafından fosforile edilir ve böylece IL-17 gibi anahtar proinflamatuar genlerin transkripsiyonunu aktive ettikleri çekirdeğe geçer (Safrany ve ark, 2009). Bu nedenle IL-23R'nin alellerinden kaynaklanan sentez artışı, STAT sinyal yolağını uyararak IL-17 üretimini arttırabilir (Safrany ve ark, 2009). IL-23R sinyali ile üretimi teşvik edilen IL-17'nin ise beyin, eklem, kalp, akciğer ve bağırsaklarda doku hasarına ve kronik iltihaba neden olduğu gösterilmiştir (Su ve ark, 2016). Ayrıca IL-17, kondrositler ve osteoblastlarda matriks üretiminin inhibe edilmesine katkıda bulunur ve bu, eklem yıkımı ve defektif doku onarımı ile sonuçlanır (Chuyan ve Chen, 2018). IL-17, ayrıca osteoklast aktivitesini/ osteoklastogenezi pozitif olarak düzenleyen NF-$_K$B ligandının reseptör aktivatörünün

(RANKL) upregülasyonunu indükleyen TNFα ve IL-1'i üretmeleri için insan makrofajlarını ve IL-6 ve IL-8'i üretmeleri için sinoviyal fibroblastları uyararak güçlü proinflamatuar ve eklem yıkıcı aktivite gösterir (bkz, şekil 9) (Daryabor ve ark, 2018). AS'li hastalarda aksiyel iskeletteki bu inflamatuar süreç ve artmış osteoblast aktivitesi eklem füzyonuna yol açabilecek aşırı kemik oluşumuna yol açar (Daryabor ve ark, 2018). Yani IL-23R'deki polimorfizmler AS gibi otoimmün hastalıklara yatkınlıkta önemli risk faktörüdür.



Şekil 9. AS'nin patogenezinde rol alan IL23/IL17 immün aksının şematik gösterimi (Daryabor ve ark,2018'den alınma)

Genin kendisinin polimorfizmlerine ek olarak, IL23'ün IL12(p40) altbirimini kodlayan IL12B lokusunun çevresindeki regülatör bölgenin polimorfizmleri de AS savunmasızlığı ile ilişkilendirilmiştir (Simone ve ark, 2018; Zhu ve ark, 2019). AS ile ilişkili diğer polimorfizmler; T hücresi proliferasyonu ve sağ kalımında rol alan EOMES, RUNX3 ile TBX21 ve doğal immün yanıtta rol oynayan CARD9 gibi IL-6 yolağına etki eden genlerde gözlenir (Simone ve ark, 2018).

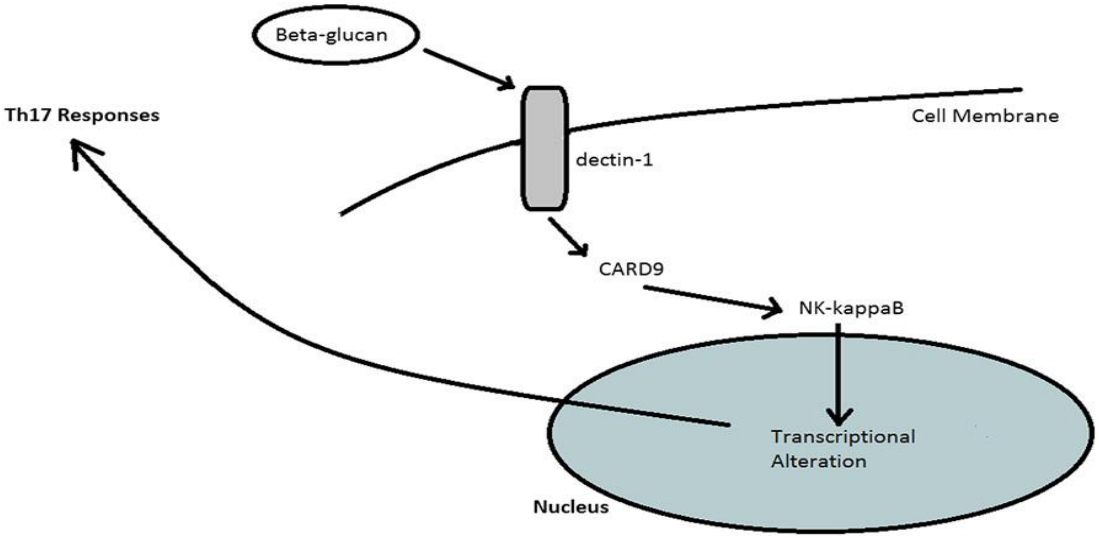
4.2.5.2.2.3. RUNX3

Kromozom 1p36'da bulunan RUNX3 geni, AS'nin gelişiminde hayati bir rol oynayan CD8+ T lenfositi farklılaşması ve gelişiminde ve dendritik hücrelerde dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β sinyal yolağının regüle edilmesinde kilit rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörünü kodlar (Costantino ve ark,2018;

Daryabor ve ark,2018; Reveille, 2012; Su ve ark,2018). IGAS immünochip çalışması, RUNX3 promotörünün yukarısında 15 kb LD bloktaki 22 SNP'nin, öncü SNP olarak rs6600247'nin, AS ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu gösterdi (Costantino ve ark, 2018). 2011 yılında GWAS'da, AS ile ilişkili olan RUNX3'teki SNP'ler, ayrıca, CD8+ T lenfosit sayısındaki azalma ile de ilişkilendirildi (Reveille, 2012).

4.2.5.2.2.4. CARD9 (Caspase recruitment domain-containing protein9)

9q34 kromozomunda bulunan CARD9 geninin ürünü, makrofajlarda ve dendritik hücrelerde yüksek oranda ekspre edilen bir sinyal proteinidir (Daryabor ve ark, 2018). Bu sinyal proteini (CARD9), şekil 10'da gösterildiği gibi mantar ve bazı bakteri hücre duvarlarının bir bileşeni olan beta-glukanı tanıyan doğal immün reseptörleri dektin-1 ve 2'den gelen sinyallere aracılık eder (Kenna ve Brown, 2013). CARD9 yoluyla sinyalizasyon, PTGER4 için ligand olan PGE2'nin üretimini tetikler (Kenna ve Brown, 2013). Yani TNF, IL-6 ve IL-23 üretimini ve IL-17 ve IL-23 salgılayan T hücrelerinin farklılaşmasını indüklemek için NF-$_K$B yolağı üzerinden sinyal göndererek IL-17/IL-23 yolağında önemli bir rol oynar (Reveille, 2012). Ayrıca CARD9'un uyarılması dendritik hücrelerin antijen sunan hücrelere farklılaşmasını tetikleyerek naif T hücrelerini interferon (IFN)-g üreten Th1 hücreleri ve/veya IL-17 üreten Th17 hücreleri haline getirebilir (Pointon ve ark, 2010). Bir mRNA ekspresyonu veri tabanının incelenmesi AS ile en güçlü şekilde ilişkili SNP'lerin CARD9 ekspresyonu ile ilişkili olanlar olduğunu ortaya koymuştur (Reveille, 2012).



Şekil 10. Patojenik proinflamatuar sitokinleri teşvik etmek için CARD9'dan sinyal veren mikrobiyal beta-glukan ve dektin-1'in etkileşimi (Robinson ve Brown,2012'den alınma)

4.2.5.2.2.5. PTGER4

Kromozom 5p13.1'de bulunan prostoglandin E reseptörü 4 geni (PTGER4, EP4), prostoglandin E2 için tanımlanan dört reseptörden birini kodlar (Rodriguez-Rodriguez ve ark, 2015). Bu reseptör, T hücreleri, makrofajlar ve sinoviyal fibroblastlar dahil olmak üzere birkaç hücre tipinde ekspre edilir (Rodriguez-Rodriguez ve ark, 2015).

PTGER4 için ligand olan PGE2'nin ekspresyonu mekanik strese cevap olarak artar ve kemik oluşumunu teşvik edecek SOST ekspresyonunu inhibe etmek için PGE2EP4 ile etki gösterir (Kenna ve Brown, 2013). PGE2 aynı zamanda dendritik hücreleri uyararak IL-23 üretimini arttırır (Reveille, 2012). Yani PTGER4, AS'de mekanik stres, inflamasyon ve kemik oluşumunu birbirine bağlayan bir rol oynar (Kenna ve Brown, 2013; Reveille, 2012). EP4, hem kemik oluşumunu stimüle ederek ve paralelinde NF-$_K$B ligandının reseptör aktivatörünün indüklenmesi yoluyla osteoklast sayısını arttırarak kemik yeniden şekillenmesini tetikler (Rodriguez-Rodriguez ve ark, 2015).

4.2.5.2.2.6. Interlökin-1 gen kümesi (IL-1)

Çok işlevli bir sitokin olan IL-1, yüksek derecede inflamatuar bir sitokin olup hemen hemen her hücreyi etkileyebilmektedir (Dinarello, 1996). IL-1, ayrıca diğer sitokinler ile, özellikle tümör nekroz faktörü ile, sinerjist olarak etki eder (Etti ve ark, 2018).

Enfeksiyon, hasar veya antijenik zorluğun ardından üretilen IL-1, dolaşıma karıştığında hormon gibi davranır ve nörolojik, metabolik, hematolojik ve endokrinolojik sistemlerde geniş bir sistemik değişiklik spekturumuna neden olur (Gresnigt ve Veerdonk, 2016). Sentezlenen IL-1'in bir kısmı ise plazma zarı ile ilişkili olarak, sistemik tepkiler üretmeksizin lokal dokularda değişikliklere neden olur (Dinarello,1996). IL-1RA'nın, hayvan modellerinde IL-1 reseptörlerine bağlanarak IL-1'in bağlanmasını inhibe ettiği ve böylece sinyalleşmeyi dolayısıyla kemik hasarını ve romatoit artritte eklem erozyonunu önlediği gösterilmiştir (McGarry ve ark, 2001). IL-1 alfa genindeki bazı SNP'lerin (rs2856836, rs17561 ve rs1894399) AS duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir (Daryabor ve ark, 2018). Bununla birlikte IL-1 reseptörlerinden tip I reseptör sinyal iletirken, tip II reseptör IL-1'e bağlanır, fakat sinyal iletmez. IL-1 reseptör tip 2, IL-1 için bir tuzak hedef olarak hareket eder ve IL-1 aktivitesini inhibe eder (Dinarello, 1996).

4.2.5.2.2.7. 2p15

2010 yılında bir GWAS çalışmasında, 2p15 kromozomu üzerindeki "gen çölleri" olarak da bilinen intergenik bölgede bulunan rs10865331 SNP ile AS duyarlılığı arasında kuvvetli bir ilişki tanımlanmıştır (Daryabor ve ark, 2018). Bu lokusun fonksiyonu bilinmemektedir (Wang ve ark, 2017); ancak Sanchez ve ark, bu intergenik bölgeyi *upstream* genlerin modülasyonunda rol alan bir transkripsiyonel regülatör faktörün bir parçası olarak ya da daha doğrusu şimdiye kadar tanımlanamayan protein kodlayan genler için proksimal bir promotör bileşeni olarak varsaymışlardır (Daryabor ve ark, 2018).

4.2.5.2.2.8. ANTXR2

4q21 kromozomundaki ANTXR2 geni, kemik ve iskelet üzerinde potansiyel etkileri olan AS ile ilişkili bir gendir (Robinson ve Brown, 2012) ve tip IV kollajene ve laminine bağlanarak ekstrasellüler matriks adezyonunda rol oynayan bir transmembran proteinini kodlar (Reveille, 2012; Ou, 2015). Bu genin varyantlarının AS'de nasıl rol oynadığı belirsizdir (Robinson ve Brown,2012).

4.2.5.3. AS'de TNFα, IL-17, IFN-γ ve IL-12 pro-inflamatuar sitokinleri

Birincil işlevi vücut hücrelerini istila eden bulaşıcı mikroorganizmaları ve mutasyonlar sonucu oluşan kanser hücrelerini T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi kemik iliğinden türevlenen çeşitli tipte kan hücreleri aracılığıyla etkisiz hale getirmek olan immün sistem normal koşullarda kendinden olan ve olmayan antijenleri büyük bir hassasiyetle ayırt etme yeteneğine sahiptir (Kuwabara ve ark, 2017). Bu nedenle kendine ait antijenlere karşı bağışıklık tepkisi geliştiremez. Bu fenomene "öz (self) tolerans" denilir. Ancak organizmanın kendisine ait antijenlerle yabancı antijenler arasındaki moleküler yapı benzerliği, tüm immün hücrelerin aşırı tepkisini baskılayarak immün süreci kontrol eden T regülatör hücrelerin çevresel ve genetik faktörlerin kompleks etkileşimi sonucu gereğinden az çalışması gibi nedenlerle organizma kendi dokularına karşı immün tepki oluşturabilir. Öz toleranstan sorumlu mekanizmaların kırılması ya da bozulması sonucu kişinin kendi antijenlerine karşı immün yanıt geliştirmesine "otoimmünite" denir (Davidson ve Diamond, 2020; Duan ve ark, 2019). Bunun sonucunda gelişen hastalıklar ise "otoimmün hastalıklar" adıyla anılır.

Otoimmün hastalıklar; (i) hedef antijenlerin ve doku bozukluklarının bir organda lokalize olduğu organa özgü otoimmün hastalıklar ve (ii)intranükleer antijen veya vücutta birçok organda geniş ölçüde ekspre edilen belirli bir antijen tipine yanıtı içeren sistemik otoimmün hastalıklar olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Davidson ve Diamond, 2020). Doku inflamasyonu, yapısal semptomlar ve eklem yıkımı ile karakterize seronegatif spondiliartropatilerin prototipi olan Ankilozan Spondilit de inflamatuar sistemik otoimmün hastalıktır.

Otoimmünitede rol oynayan farklı immün hücre tiplerinin birbirleriyle iletişim kurmasına yol açan moleküller sitokinlerdir. Bağışıklık sisteminin hücreleri arasında haberci görevini gören sitokinler lenfositlerin proliferasyonunu, farklılaşmasını veya göçünü stimüle ederek ya da baskılayarak immün tepkinin şiddetini ve süresini regüle eder (Inshaw ve ark, 2018). Dolayısıyla, öze karşı immün yanıtın gelişmesinden başlayarak dokuda hasarın gerçekleşmesine kadar otoimmün hastalıkların oluşumunun her aşamasında belirleyici rolleri vardır (Davidson ve Diamond, 2020). Sitokinler moleküler ağırlığı 30 kDa'dan (<200 aminoasit) az olan

küçük, yapısal olmayan glikoproteinler veya pleiotropik proteinlerdir (Gulati ve ark, 2016) ve birçok hücre tarafından salgılanmasına rağmen, çoğunlukla makrofajlar ve bir tür T hücresi olan CD4+ hücreleri tarafından üretilirler (Seldin, 2015). Hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanarak, doğal ve adaptif (kazanılmış) bağışıklıkta rol oynayan sitokinleri üretmeleri için, gen ekspresyonunu değiştiren sinyal iletim yolaklarını tetiklerler (Inshaw ve ark, 2018; Seldin, 2015).

CD4+ T hücreleri ürettikleri sitokinler ile mikroortamdaki diğer immün hücreleri aktive etmeye yardımcı oldukları, onların fonksiyonlarını düzenledikleri için yardımcı T hücresi (Th) olarak da adlandırılırlar (Kuwabara ve ark,2017). Sitokin salgılama paternlerindeki farklılıklar nedeniyle farklı biyolojik fonksiyonlara sahip olan Th1, Th2, Th17 ve T regülatör hücreleri gibi alt grupları vardır (Gulati ve ark,2016).

4.2.5.3.1. TNFa

Özellikle monositler/makrofajlar tarafından salgılanan ancak T ve B lenfositleri, mast hücreleri, doğal katil hücreleri, nötrofiller, fibroblastlar, endotel hücreleri ve osteoklastlar tarafından da düşük miktarlarda da olsa üretilebilen tümör nekroz faktör alfa (TNFa), çeşitli hücre tipleri üzerinde pleiotropik etkileri olan bir sitokindir (Sedger ve McDermott, 2014; Jang ve ark, 2021). TNFa'nın oluşturacağı etki; bu sitokinin miktarına, hedef hücrenin çeşidine, sitokinin hücreyi uyarma süresine bağlıdır (Jang ve ark, 2021). TNFa'nın ana fizyolojik etkisi, nötrofilleri ve monositleri aktivasyonlarını takiben bir enfeksiyon bölgesine toplayarak immünolojik ve inflamatuar yanıtı teşvik etmektir (Vitale ve ark, 2007). Düşük konsantrasyonlarda salgılandığında, TNFa vazodilatasyonu teşvik etmek için endotel hücrelerine hareket eder ve bu hücreleri adezyon moleküllerini ve göçten sorumlu *kemokin* olarak adlandırılan bir lökosit-kemotaksis sitokin grubu salgılaması için stimüle eder (Jang ve ark, 2021). Sonuçta enfeksiyon bölgesine nötrofil ve makrofajların yapışmasına aracılık eder (Çayakar, 2018) ve ortaya çıkan lokal inflamasyon enfeksiyonlar ile mücadele eder. TNFa, ayrıca osteoklastogenezi stimüle ederek ve osteoblast fonksiyonunu inhibe ederek kemik homeostasisinin regülasyonunda rol oynayan birçok proinflamatuar sitokinden biridir (Osta ve ark, 2014). TNFa, osteoblastlarda DNA ve kollajen sentezini ve osteokalsin gen

ekspresyonunu inhibe eder; daha sonra plasminojen aktivatörleri, matriks metalloproteinazları, IL-8 ve IL-6 gibi sitokinler ve bu hücrelerde monosit-makrofaj koloni-stimüle edici faktör (MCSF) gibi proteolitik enzimlerin sentezini stimüle eder (Azuma ve ark, 2000). Olgun osteoklastları aktif hale getirerek veya osteoklast prekürsörlerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını stimüle ederek kemik rezorbsiyonunu indükler (Azuma ve ark, 2000). Yani TNFa, inflamatuar artritte eklem inflamasyonu ve kemik tahribatının ana aracısıdır (Kitaura ve ark, 2013).

TNFa; transmembran TNF ve çözünür TNF olmak üzere iki ayrı formda bulunabilir: Öncelikle 26 kDa ve 233 aminoasitlik bir transmembran glikoproteini olarak sentezlenen ve hücre yüzeyinde bulunan membran TNFa (mTNFa), daha sonra TACE (TNFa dönüştürücü enzim) tarafından parçalanarak 17 kDa ve 157 aminoasitlik çözünür TNFa (sTNFa) halinde kan plazmasına bırakılabilir (Holbrook ve ark., 2019). mTNFa ve sTNFa, tüm insan dokularında sentezlenen TNFR1 veya esas olarak immün hücrelerde sentezlenen TNFR2 reseptörlerinden birine bağlanarak etki gösterir (Osta ve ark, 2014; Holbrook ve ark, 2019). TNFa'nın reseptörlerine bağlanması inflamatuvar tepki, hücre sağ kalımı, hücre bölünmesi (çoğalması) ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları desteklemek için üç tip hücre içi sinyalleme yolağını (NF-kB, MAPK-JNK ve kaspaz-8 aracılı yolakları) aktive eder (You ve ark, 2021). Sadece mTNF tarafından aktive edilebilen, fakat sTNF ile aktive edilemeyen TNFR2 lenfoid sistemde önemli rol oynarken, hücrelerin büyük çoğunluğunda TNF sinyalleşmesinin ana aracısı TNFR1'dir (Wajant ve ark, 2003). TNFR1'in stoplazmik kuyruğu bir ölüm domainini (DD) içerirken, TNFR2 intracellüler DD'ye sahip değildir. TNFa'nın TNFR1'e bağlanması üzerine, TNFR1'in stoplazmik kuyruğunda bulunan DD konformasyonel değişime uğrar ve bu kısma *TNFR-associated death domain protein* (TRADD) bağlanır (Çayakar, 2018; Holbrook ve ark, 2019). Ardından RIPK1, TRAF2/5, cIAP1/2 ve LUBAC dahil olmak üzere çeşitli komponentlerin etkileşmesi NF-$_K$B kinazının inhibitörünü aktive eder (Jang ve ark, 2021). Uyarılmamış hücrelerde NF-$_K$B, nüklear lokasyon sekanslarını maskelemek için I_KB adı verilen bir inhibitöre doğrudan bağlanarak sitozolde aktif olmayan bir halde tutulur (Wajant ve ark, 2003). TNFa'nın reseptörüne bağlanması ile I_KB kinaz aktive olur ve I_KB üzerindeki iki N ucu serini fosforiller. Daha sonra bir E3 ubikütin ligaz, bu fosfoserinlere bağlanır ve I_KB'yi

çoklu biçimde ubikütinleyerek onun hızlı biçimde proteazom ile yıkılmasını tetikler (Lodish ve ark,2011). I_KB'nin yıkımı NF_KB'nin her iki alt birimindeki nüklear yerleşim sinyalini açıkta bırakır ve onların nükleusa geçmesine neden olur (Lodish ve ark, 2011). NF-$_K$B nükleusda, TNF'ye yanıt olarak, çok sayıda enflamatuar ile ilişkili hedef geninin transkripsiyonunu aktive eder (Wajant ve ark, 2003). TNF'nin indüklediği NF-$_K$B inflamasyon için önemlidir, çünkü NF-$_K$B çok sayıda proinflamatuar sitokin, kemokin ve bunların reseptörlerinin global bir transaktivatörü ve lökosit aktivasyonu ve fonksiyonunun kritik bir düzenleyicisidir (Sedger ve McDermott, 2014).

TNFa, kemik yıkımını yapabilen osteoklastların farklılaşmasını ve fonksiyonunu indükleyen anahtar faktör olan NF-$_K$B reseptör aktivatörünün ligandını (RANKL) sentezlemeleri için osteoblastları ve doku stromal hücrelerini aktive ederek enflamatuar kemik yıkımını teşvik eder (Zhao ve ark, 2012). RANKL, osteoklast öncüllerinin yüzeyinde bulunan bir membran bağlayıcı protein olan RANK'a bağlanarak, osteoklastogenezin ana düzenleyicisi olan bir transkripsiyon faktörü NFATc1 (aktif T hücrelerinin nükleer faktörü stoplazmik 1)'in sentezlenmesini ve fonksiyonunu tetikler (Kitaura ve ark, 2013). NFATc1 osteoklast farklılaşması, füzyonu ve kemik yıkımı için önemli olan genlerin ekspresyonunu aktive eder (Zhao ve ark, 2012).

4.2.5.3.2. IL-17

IL-17 (IL-17A), IL17A'dan IL-17F'ye kadar 6 üyeden oluşan IL-17 enflamatuar sitokin ailesinin kurucu üyesidir (Das ve Khader, 2017). IL-17 proteini 15 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip 150 aa'den oluşur ve geni insan kromozomu 6p12'de bulunur (Chyuan ve Chen, 2018). IL-17 ailesinin baskın proinflamatuar sitokinleri olan IL-17A ve IL-17F %55 aminoasit benzerliğini paylaşırlar ve disülfid bağlı homodimerler ya da heterodimerler (IL17A/F) olarak bulunurlar (Amatya ve ark, 2017; Gu ve ark, 2013). Son derece homolog olan IL-17 ve IL-17F'nin fonksiyonları kısmen örtüşmektedir (Moseley ve ark, 2003). IL-17; gama delta T hücreleri, NKT hücreleri, NK hücreleri, nötrofiller ve eozinofiller de dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilse de, IL17'nin birincil kaynağı Th17 hücreleridir (Amatya ve ark,2017; Das ve Khader, 2017; Kuwabara ve ark, 2017). Dolayısıyla hem doğal hem

adaptif (kazanılmış) bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından üretilen efektör sitokinlerdir (Xi ve ark, 2019). Hem hücre içi ve hücre dışı patojenlere karşı koruyucu bağışıklıkta ve hem de otoimmün inflamatuar hastalıkların patogenezinde kritik bir rol oynar (Kuwabara ve ark, 2017). Ağırlıklı olarak *aktive edilmiş T hücreleri* tarafından üretilen IL17, T hücrelerini eyleme hazır hale getirir (Iwakura ve Ishigame, 2006). Ana rolü, inflame olmuş dokularda kemotaksisin teşvik edilmesini ve başlatılmasını ve nötrofillerin takviyesini ve aktivasyonunu sağlamaktır (Schinocca ve ark, 2021). Bakteri enfeksiyonundan sonra, enfeksiyon bölgesinde yerleşik T hücreleri tarafından üretilen IL-17, stromal hücrelerden G-CSF üretimini indükler (Iwakura ve Ishigame, 2006). Böylece enfeksiyon bölgesine nötrofil takviyesi arttırılır. Ayrıca fibroblastlar, makrofajlar, endotelyal ve epitel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerini *sitokinler (TNFa, IL-1b, IL-6, GMCSF, G-CSF), kemokinler (CXCL1, CXCL8, CXCL10)* ve metalloproteinazlar gibi proinflamatuvar mediyatörleri üretmeleri için uyarır (Jetwa ve Bowness, 2016). Bu durum inflamasyonun tetiklenmesine neden olur. Eklem kıkırdağı, kemik, menisküs, beyin, hematopoetik doku, böbrek, akciğer, deri ve bağırsak gibi farklı dokularda etkindir (Jetwa ve Bowness, 2016). Sonuçta, kondrositlerin ve kıkırdak matriksinin yıkımına (kıkırdak proteoglikanlarının ve kollajenin enzimatik bozunmasına) ve üretiminin baskılanmasına yol açar. Ayrıca, nitrik oksit üretimini ve indüklenebilir nitrikoksit sentazın mRNA seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Zenobia ve Hajishengallis, 2015). Artan NO seviyeleri hücredışı matriksin yıkımına ve kondrosit hasarına, bu da eklem fonksiyonunda azalmaya neden olur (Zenobia ve Hajishengallis, 2015). Yani IL-17 matriks bozulması yoluyla doğrudan ya da aktifleştirilmiş enflamatuar hücreleri toplayarak ve iltihapli dokuya neden olan IL-1b ve TNFa dahil diğer proinflamatuar sitokinleri salgılatarak dolaylı yoldan doku hasarına neden olur (Aggarwal ve Gurney, 2002).

IL-17 biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirmek için hedef hücreler üzerindeki sitokin reseptörü IL-17R'yi kullanır (Das ve Khader, 2017). İnterlökin-17 reseptör ailesi IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD ve IL-17RE olmak üzere beş reseptör altbirimini içerir (Schinocca ve ark, 2021). Bu reseptör alt birimleri hücre dışı *fibronektin-III benzeri domain* ve stoplazmik "SEFIR" domaini gibi bazı korunmuş yapısal motifleri içerir (Gaffen, 2009). IL-17, IL-17F ve IL-17A/F heterodimeri IL-

17RA ve IL-17RC'den oluşan heteromerik bir kompleks olan IL-17R vasıtasıyla fonksiyonlarını gerçekleştirir (Das ve Khader,2017; Gu ve ark, 2013). IL-17RA veya IL-17RC'nin eksikliği IL-17 ve IL-17F'nin enflamatuar fonksiyonunu tamamen ortadan kaldırır (Angkasekwinai ve Dong, 2011). IL-17RA yüksek oranda hematopoetik hücreler üzerinde, düşük oranda epitel hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, osteoblastlar ve miyeloid hücreleri gibi hematopoetik olmayan hücreler üzerinde ekspre edilirken, aksine IL-17RC hematopoetik hücrelerde düşük seviyelerde, hematopoetik olmayan hücrelerde yüksek oranda ekspre edilmektedir (Chuyan ve Chen, 2018). IL-17R her yerde ekspre edilse de, genellikle IL-17'nin primer cevaplayıcıları hematopoetik olmayan hücrelerdir (Amatya ve ark, 2017).

IL-17, reseptörü IL-17R aracılığıyla NF-kB aktivatörü adaptör proteinini (ACT1) ative eder. Bu da p38MAK, JNK, ERK, JAK, STAT, PI3K gibi mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK'lar) içeren *downstream* yolakları harekete geçirir (Schinocca ve ark, 2021). Böylece, novo gen transkripsiyonunu tetikleyerek veya hedef mRNA transkriptlerini stabilize ederek inflamatuar gen ekspresyonunu uyarır (Amatya ve ark, 2017). Sonuçta, otoimmün hastalıkların inflamatuar patogenezi ve konakçı savunması için gerekli olan proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler (IL-1b, IL-6, TNFa, CCL2), antimikrobiyal peptitler (beta-defensin) ve matriks metalloproteinazlar üretilir (Das ve Khader, 2017; Gu ve ark,2013; Qian ve ark,2010).

IL-17A zayıf bir NF-$_K$B aktivatörü olmasına rağmen onu böyle bir patojenik sitokin yapan şey proinflamatuar tepkileri teşvik etmek ve sürdürmek için TNF-a gibi diğer sitokinler ile sinerji içinde çalışmasıdır (Gu ve ark,2013). Güçlü bir NF-$_K$B aktivatörü olan TNF-a yüksek derecede kararsız proinflamatuar mRNA'ların sentezini uyarırken, IL-17A bu mRNA'ları stabilize ederek kemokin sentezini arttırır (Gu ve ark,2013). Ligand-reseptör birleşmesinden sonra IL-17RA ve TRAF6 arasındaki kritik bir ara adaptör olan Act1, reseptör kompleksine SEFIR bağımlı etkileşimler yoluyla bağlanır (Chuyan ve Chen, 2018). Act1, TRAF6'yı ve K63E$_3$ ligazını tutan ve ubiküne eden bir Lisin-63(K63)E$_3$ ubikuitin ligazdır (Amatya ve ark,2017) ve ayrıca 2 tane TRAF bağlama bölgesine sahiptir (Qian ve ark,2010). TRAF6, Act1'in TRAF bağlayıcı motifleri ile etkileşimi sayesinde sürece dahil edilir

(Gu ve ark,2013). TRAF6'nın ubikinleştirilmesi, TGFb ile aktive edilmiş kinaz1'in ve IKKa, IKKb ve IKKg'dan oluşan NF-$_K$B kinaz inhibitör kompleksinin aktivasyonunu sağlar (Amatya ve ark, 2017). IKK, daha sonra NF-$_K$B:I_KB kompleksinin alt ünitesini fosforile ederek proteasomal yıkım için I_KB'yi işaretler (Amatya ve ark, 2017). I_KB'nin bozulması, NF-$_K$B üzerindeki nüklear lokalizasyon sinyalini açığa çıkararak onu hızlı nüklear translokasyon ve bunun sonucunda enflamatuar gen transkripsiyonu için serbest bırakır (Amatya ve ark, 2017). Ayrıca IL-17A uyarımı üzerine IKK_i olarak adlandırılan bir kinaz IL-17A uyarımı üzerine IL-17R-Act1 kompleksine alınarak burada Ser311'deki Act1'i spesifik olarak aktive eder (Gu ve ark,2013). Bu, Act1/TRAF2/TRAF5 arginine and serine-rich splicing factor SRSF1(SF2(ASF)) komplesi oluşturmak amacıyla TRAF2 ve TRAF5 için bir kenetlenme bölgesi oluşturur (Gu ve ark,2013). Bu kompleksin oluşumu ASF'nin bölünmesi için CXCL1 Mrna'nın 3'UTR ucuna bağlanmasını önleyerek CXCL1 mRNA stabilitesini arttırır (Gu ve ark, 2013).

4.2.5.3.3. IFNg

Tek *tip-II interferon* olan IFNg, fizyolojik ve patolojik ortama bağlı olarak proinflamatuar veya anti-inflamatuar etki yaratabilen pleiotropik bir sitokindir (Lees, 2015). IFNg'nın lenfoid hücrelerde yaygın olarak üretildiğini destekleyen bulgular olsa da, esas olarak NK hücreleri ve CD8+ T hücreleri tarafından salgılanır (Xu ve Li, 2017). Doğal bağışıklık yanıtı sırasında IFNg, makrofaj ve dendritik hücrelerin yanı sıra NK ve NKT hücreleri tarafından üretilirken; kazanılmış bağışıklıkta, enfeksiyon kontrolündeki CD8+T hücreleri ile inflamatuvar yanıtları ve hücre içi patojenlerin temizlenmesini teşvik eden CD4+ T yardımcı 1 (Th1) alt kümesi tarafından üretilir. (Pollard ve ark, 2013). Virüs üremesinin baskılanması, hücre büyümesi ve ölümünün düzenlenmesi, tümör direnci/gelişimi gibi birçok süreçte rol oynayan IFNg, immünoregülatör (bağışıklığı düzenleyici) fonksiyonlara da sahiptir (Xu ve Li, 2017). NK hücreleri tarafından üretilen IFNg, inflamatuar bölgede monositlerin makrofaj ve dendritik hücrelere olgunlaşmasını uyarır (Lees, 2015); makrofajları M1 fenotipine doğru aktive eder (Green ve ark, 2017). Olgunlaşan makrofaj ve dendritik hücreler yüksek seviyelerde IL-1b, IL-12, IL-23 ve TNFa gibi proinflamatuar sitokinleri üretip salgılar (Green ve ark,2017). Salgılanan IL-12 ise

naif CD4+T hücrelerinin Th1 fenotipine farklılaşmasını sağlar. Oluşan Th1 hücreleri IFNg üretir. IFNg, kondrositlerin yüzeyindeki MHC-I moleküllerinin yapımını arttırır (Rezaiemanesh, 2018). Bazı kondrosit antijenlerini MHC-I ile yüzeylerinde sunan kondrositler CD8+T hücrelerine daha duyarlı hale gelir (Rezaiemanesh, 2018). Kondrosit yüzeyindeki MHC-I/antijen kompleksi CD8+T hücresi yüzeyindeki TCR'ler tarafından tanınır. Naif CD8+T hücresi sitotoksik T lenfositlerine (CTL) farklılaşır. Olgunlaşan CTL, perforin ve granzime enzimlerini içeren granüllerini hücre dışına salgılar. Perforin kondrosit yüzeyinde porlar oluştururken, granzime bu porlardan içeri girerek kaspazları aktive eder ve hücreyi apoptoza (hücre ölümüne) yönlendirir. Bunun sonucunda kartilaj (kıkırdak) yıkımı gerçekleşir. IFNg, ayrıca monosit, makrofaj ve nötrofillerde nitrikoksit gibi reaktif oksijen türlerinin üretimini tetikler (Green ve ark, 2017). Th2 ve Th17 yanıtlarını baskılarken, Th1 immün yanıtının tüm yönlerini destekleyen proinflamatuar bir molekül olarak görev yapar (Shachar ve Karin, 2013). Antijen sunan hücrelerin antijen işleme ve antijen sunma kabiliyetlerini arttırır, miyeloid hücrelerin inflamasyon bölgesine alınması için gerekli sitokinlerin ve kemokinlerin sentezini uyarır (Shachar ve Karin, 2013). Ayrıca sabit koşullar altında MHC Sınıf II antijenini üretmeyen hücrelerde de MHC sınıf II moleküllerinin üretilmesini ve böylece CD4(+) T hücresinin tanınması ve aktivasyonu için yeni hedefler sağlar (Lees, 2015).

IFNg reseptörü (IFNGR), IFNGR1 ve IFNGR2 olarak adlandırılan iki reseptör zincirinin kompleksinden oluşan heterodimerdir (Miller ve ark, 2015). IFNg ligandının bağlanması reseptör oligomerizasyonu ve reseptöre bağlı JAK1 ve JAK2'nin aktivasyonuna yol açar (Miller ve ark, 2015). JAK'ların aktivasyonundan sonra STAT1 molekülleri SH2 domainleri aracılığıyla bölgeye toplanır ve homodimerler oluşturur (Lees, 2015). Bu durum çekirdek içine geçişe ve IFNg ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesine ve IFNg üretiminin artmasına yol açar (Lees, 2015). Kontrolsüz artan IFNg, geniş doku hasarına neden olabilir.

4.2.5.3.4. IL-12

T hücresi tepkilerinin düzenlenmesinde kritik rol oynayan IL-12 sitokin familyası; alt birim, reseptör ve sinyalleme seviyelerinde homolojiyi paylaşan ve bu nedenle JAK/STAT sinyal yolaklarının benzer üyelerini aktive eden 4 üyeden oluşur: IL-12,

IL-23, IL-27 ve IL-35 (Gee ve ark, 2009). IL-12, IL-23 ve IL-27 naif T hücrelerine antijen sunumu sırasında antijen sunan hücreler tarafından salgılanırken; IL-35 düzenleyici T ve B hücrelerinin bir ürünüdür (Sun ve ark,2015).

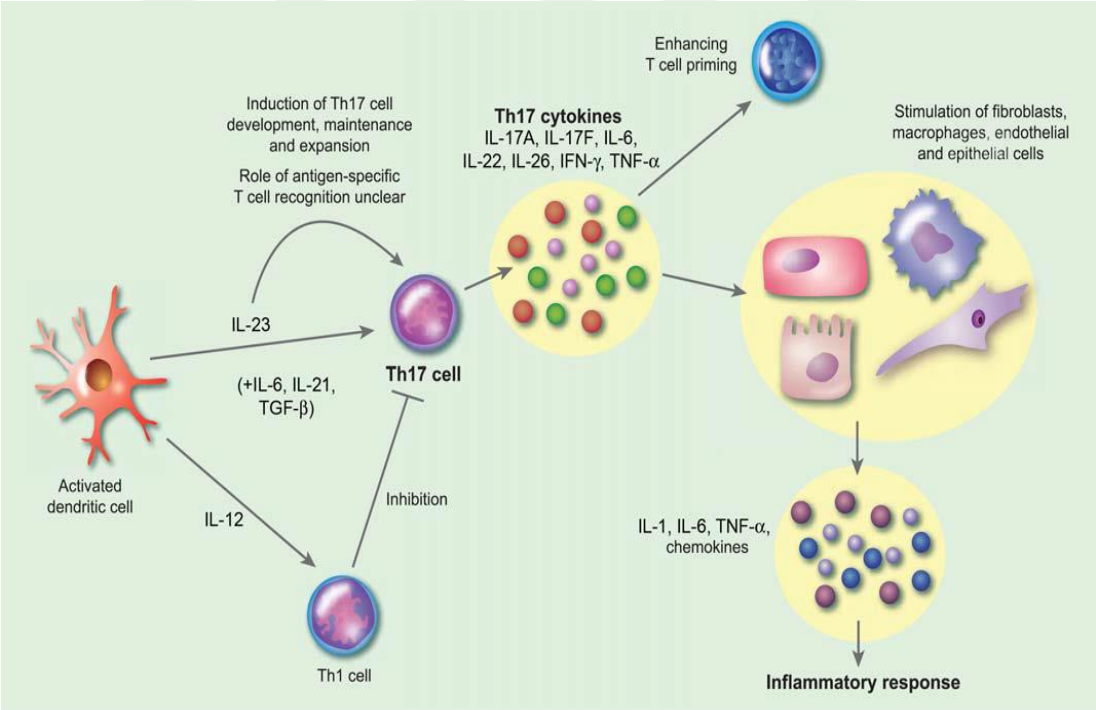
IL-12 (IL-12p70), p35 ve p40 alt birimlerinden oluşur (Gee ve ark,2009). Ana fizyolojik üreticileri monositler, dentritik hücreler ve makrofajlar gibi antijen sunan hücreler olup, çeşitli hematopoetik hücre tipleri tarafından da salgılanır (Sun ve ark, 2015). Çeşitli patolojik organizmaların ya da bunların ürünlerinin dendritik hücreler ya da makrofajlar üzerindeki Toll-benzeri reseptörlere (TLR'lere) bağlanması sonucu üretilir (Stestko ve Sauder, 2008). Üretilen IL-12; naif CD4+T hücrelerinin Th1 fenotipine farklılaşmasını uyarır (Vecchio ve ark, 2007). Bu özelliği nedeniyle IL-12, hücre aracılı immünitenin önemli bir düzenleyicisidir ve doğal immünite ile adaptif immünite arasında köprü kurar. Perforin ve granzime gibi sitolitik faktörleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu ve böylece naif CD8+T hücrelerinin sitotoksik T lenfositlerine farklılaşmasını uyarır ve sitotoksik aktivitesini arttırır (Trinchieri, 2003; Gee ve ark, 2009). Adezyon moleküllerinin yapımını uyararak NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini arttırır (Trinchieri, 2003; Gee ve ark, 2009). Ayrıca CD8+T hücreleri ve NK hücreleri tarafından IFNg üretimini arttırır (Stestko ve Sauder, 2008). Ayrıca B hücreleri tarafından IgG2a antikorlarının üretimini indüklerken, IgE ve IgG1 antikorlarının üretimini inhibe eder (Stestko ve Sauder, 2008).

IL-12, IL-12Rb1 ve IL-12Rb2 zincirlerinden oluşan heterodimerik reseptörü IL-12R'nin uyarılması ile algılanır. Reseptörün uyarılması JAK-STAT sinyal yolağını aktive eder ve STAT4'ün fosforilasyonu hücresel tepkiye neden olur (Tugues ve ark, 2015). IL-12R kompleksi NK hücreleri, NKT ve aktif T hücreleri üzerinde bulunur; fakat aynı zamanda miyeloid kökenli hücre tiplerinin ve B hücrelerinin üzerinde de tespit edilmiştir (Tugues ve ark, 2015).

4.2.6. Araştırmanın hipotezine ve yöntemine dayanak oluşturan literatüre dayalı özet

Hastalığın etiyolojisi ve patogenezi kesin olarak bilinmemekle birlikte, AS'nin otoinflamatuvar ve immün aracılı bir hastalık olduğu, doğal bağışıklık hücreleri ve onların sitokin salgıları ile adaptif immün hücreler ve onların sitokin salgılarının

AS'nin patogenezinde rol oynadığına dair veriler ortaya koyan çok sayıda çalışma mevcuttur: Wang ve ark, 2015; Zhao ve ark, 2017; Lımón-Camacho ve ark, 2012; Duftner ve ark, 2003; Raffeiner ve ark. 2005 gibi. Literatürde verilerle desteklenen ve bu çalışmanın hipotezine dayanak oluşturan hastalığın patogenezine dair senaryo özetle şöyledir: Antijen sunan hücrelerde HLA-B27/peptid kompleksinin yanlış katlanması sonucu oluşan IL-23, CD4+ T hücresinin IL-17 üreten Th17 hücresine farklılaşmasını sağlar. IL-17, makrofajlar tarafından TNFa üretimine neden olur. Makrofajlardan salgılanabilen TNFa ise, osteoklastogenezi tetikleyip kollejenaz ve matriks metalloproteinaz üretimini attırır ve osteoproliferasyonu engeller. Yani eklem yıkımına neden olur ve yeni kemik oluşumunu engeller. İnflamatuar bölgede monositlerin farklılaşması sonucu oluşan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından salgılanan IL-12, CD4+ T (T_{H0}) hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını uyarır. Th1 hücreleri ise, IFNg salgısı ile kondrositlerin antijen sunumunda artışa ve böylece sitotoksik T hücrelerine daha duyarlı hale gelmesine, inflamasyonun devamına ve AS'nin ilerlemesine neden olur. Bu olaylar, şekil 11'de özetlenmektedir.



Şekil 11. IL23/IL17 yolağı (Jetwa ve Bowness, 2016)

T (CD3+) lenfosit alt kümeleri ile AS'nin ilerleyişi arasındaki korelasyonu araştıran Wang ve diğ. 2015, sağlıklı kontrollere kıyasla AS'li hastalarda Th1 ve Th17 hücre yüzdesinin anlamlı derecede daha yüksek olduğunu ve bunun IFNg ve IL-17 sitokin

üretiminin artmasına neden olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca literatüre göre, romatizmal hastalıklarda rol oynayan makrofajlardan M1 makrofajlar yüksek seviyede proinflamatuar sitokin salgılarken, M2 makrofajlar proinflamatuar sitokinlerin azaltılması yoluyla inflamasyonun çözülmesinde rol oynar (Laria ve ark, 2016). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada, doğal ve adaptif immün hücrelerin (periferik kan mononüklear hücrelerin-PBMC) birbirleriyle ve inflamatuar bölge ile iletişimini sağlayabilmek amacıyla oluşturduğu eksozomların AS'nin patogenezinde rol oynadığı ve bu eksozomların AS'nin oluşumu ve gelişimi için önemli pro-inflamatuvar sitokinleri taşıdığı ileri sürülmektedir.

4.3. Eksozomlar

Esasen tüm hücre tipleri tarafından birçok (pato)fizyolojik durumda salgılanabilen hücre dışı veziküller *(extracellular vesicle, EV)*, Hücrenin yakın veya uzak diğer hücrelerle iletişim kurabilmesini sağlayan, transmembran proteinleri içeren ve sitozolik proteinler ile RNA'yı çevreleyen bir lipid çift tabakasından oluşan, nano ila mikro boyutlu membran veziküllerinin heterojen populasyonlarıdır (Willms ve ark, 2018; Tkach ve Thery, 2016). EV'ler biyofiziksel özellikleri ve biyogenez mekanizmalarına dayanarak ***eksozomlar, mikroveziküller*** ve ***apoptotik cisimler*** olmak üzere üç ana alt populasyona ayrılmaktadır (Pugholm ve ark, 2015; Willms ve ark, 2018).

Eksozomlar; endositoz sırasında meydana gelen erken endozomların membranının içe doğru girintiler yapması sonucunda oluşan multiveziküler cisimciklerin plazma membranı ile kaynaşması sonucu hücre dışına salınan veziküllerdir (Bozkurt, 2018; Denzer ve ark, 2000; Ruiz-Lopez ve ark, 2018). Son 30 yılın en büyük buluşlarından biri olarak görülen eksozomlar (Bozkurt, 2018), ilk olarak 1983'te Pan ve Johnstone tarafından keşfedilmiştir (Zhang ve ark, 2015). Bu iki bilim adamı, transferrin reseptörlerinin plazma membranlarından retikulositlere hareketini izlemek için transferrin reseptörleri işaretli olan immatur kırmızı kan hücrelerini (retikulositleri) kültürde çoğalttığında, işaretlenmiş transferrin reseptörlerinin retikulositlerin içine alındığını ve daha sonra küçük veziküller halinde (~50nm) yeniden paketlendiğini gözlemlemişlerdir (Edgar, 2016; Li ve ark, 2017). Daha sonra, 1989'da bu veziküllere ***eksozom*** adı verilmiştir.

Eksozomlar vücutta bulunan hücrelerin neredeyse tamamı tarafından, hem normal hem de hastalık durumlarında üretilip salgılanabilirler ve bütün vücut sıvılarında bulunabilirler (Piszczatowska ve ark, 2021). Kan, idrar, ağız içi salgı, beyin-omurilik sıvısı, eklem sıvısı, nasal salgılar, amniyotik sıvı, anne sütü, serum, plazma, meni, safra gibi bütün vücut sıvılarının bir mikrolitresinde binlerle milyonlar arasında eksozom bulunur (Zeringer ve ark, 2015; Zhang ve ark, 2019).

4.3.1. Eksozomların fiziksel ve biyokimyasal özellikleri

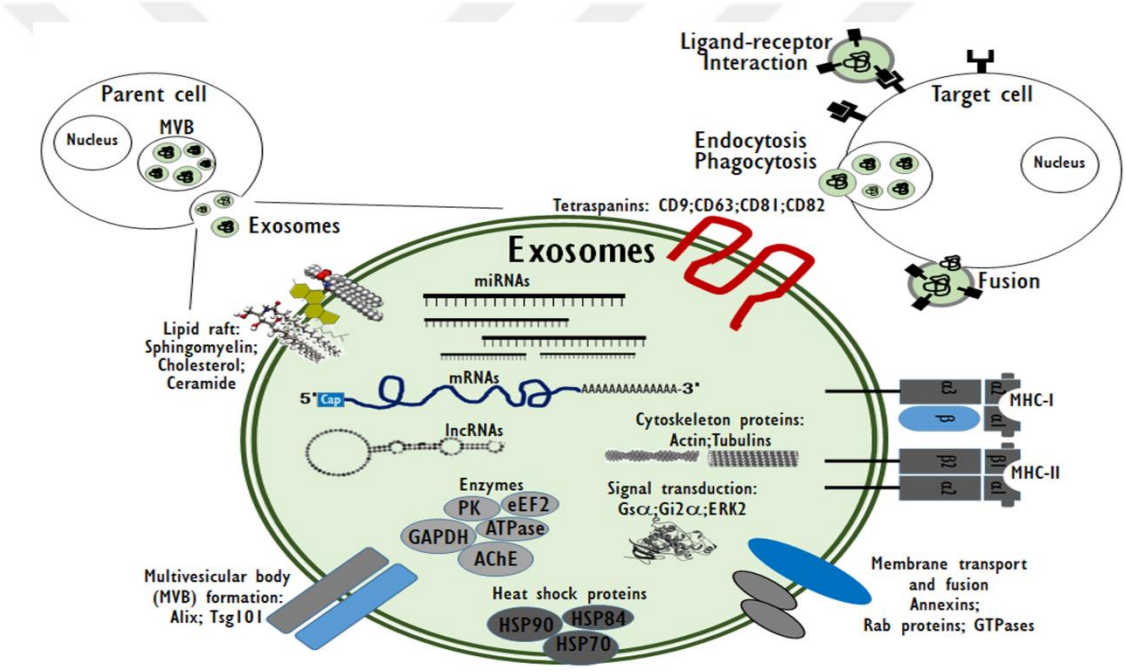
Eksozomların boyutu hakkında bir fikir birliği yoktur (Ruiz-Lopez ve ark, 2018). Farklı araştırmalarda eksozomlar tanımlanırken verilen boyutlar 60-80 nm (Denzer ve ark, 2000), 30-150 nm (Sharma ve ark, 2018; Zeringer ve ark, 2015), 40-100 nm (Zhang ve ark, 2015), 40-200 nm (Ruiz-Lopez ve ark, 2018) arasında değişmektedir. Sukroz gradyanında 1.13-1.21 g/dl yoğunluğa sahip eksozomlar, bir elektron mikroskobu altında incelendiğinde, düzleştirilmiş (basık) küreler olarak görünürler, karakteristik çanak şekilli morfoloji gösterirler (Dai ve ark, 2008; Li ve ark, 2017). Fakat kriyo-elektron mikroskop incelemelerde ise eksozomlar yuvarlak şekilli morfoloji gösterirler (Li ve ark, 2017). Bu nanokesecikler, yaklaşık 5nm'lik ortalama kalınlığa sahip olan karakteristik çift fosfolipid tabakasına sahiptirler (Edgar, 2016).

Eksozomlar, şekil 12'de gösterildiği gibi, zarlarında ve sitosollerinde lipit, protein ve nükleikasitler (DNA fragmenti, mitokondriyal DNA, mRNA, miRNA, lncRNA) gibi çeşitli biyomolekülleri taşıyabilirler. Eksozomların membranındaki protein ve lipid içeriği, köken aldıkları hücrenin plazma membranınkine benzer (Pugholm ve ark, 2015). Fakat eksozomların lipid içeriği plazma membranının kopyası değildir, lipid kompozisyonu daha farklıdır. Kolesterol, seramid, fosfatidilserin, sfingomiyelin, heksosilseramid, glikolipidler ve serbest yağ asitleri ana hücreye kıyasla eksozom membranında zenginleştirilmiştir (Jan ve ark, 2019). Ayrıca farklı hücre tiplerinden türevlenen eksozomların lipid içeriği de farklıdır. Eksozomlar, büyük ölçüde hücresel orjinlerine bağlı olarak endositik, sitozolik ve plazma membranı orjinli spesifik proteinleri taşır (Jan ve ark, 2019). Eksozomlar,

- Tetraspaninler (CD9, CD63, CD81 ve CD82)
- Major doku uyumuluk kompleksi molekülleri (MHC I ve II)
- Endozomal yolağa özgü proteinler

1. MVB oluşum makinesinde yer alan proteinler (TSG101 ve ALIX)
2. Isı-şok proteinleri (Hsc70,Hsp90)
3. Membran transport ve füzyon makinesine ait proteinler (GTPazlar, annexin'ler, Rab'lar ve flotillin'ler)

bakımından zenginleştirilmiştir (Pugholm ve ark, 2015; Wei ve ark, 2021; Chen ve ark, 2022). Bu proteinler bütün eksozomlarda bulunmasa da büyük bir kısmında bulundukları için eksozomal belirteç olarak kabul edilmektedirler (Zhang ve ark, 2019). Bu moleküllerin varlığı köken aldıkları hücre tipine bağlı değildir. Oluşum mekanizmasından ve ana hücreden bağımsız olarak bu proteinleri bulundurmaktadır. Ancak köken aldıkları hücreye karakteristik antijenleri de taşırlar.



Şekil 12. Eksozomların kompozisyonu ve hedef hücre ile etkileşimi (Kim ve ark, 2018'den alınma)

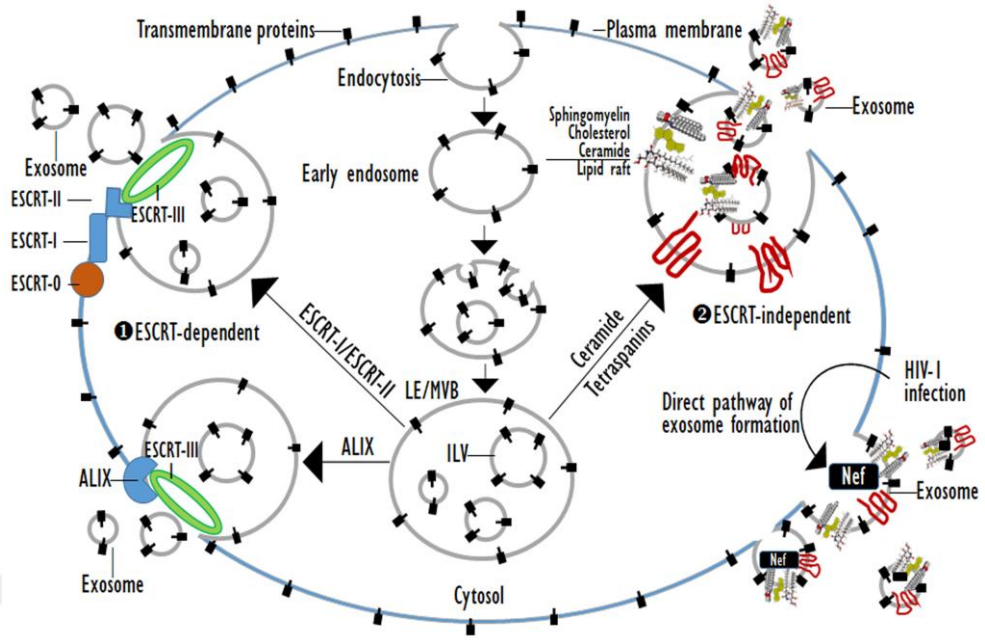
Eksozomların içeriği, köken aldıkları hücrenin türüne ve hücrenin o anki fizyolojik durumuna göre değişir (Kim ve ark, 2018; Pan ve ark, 2018; Jan ve ark, 2019). Dolayısıyla sağlıklı ve hasta kişilerde ve hastalığın farklı evrelerinde eksozomların taşıdığı biyomoleküllerin çeşidi ve miktarlarının farklı olması anlamlıdır (Pan ve ark, 2018).

4.3.2. Eksozom biyogenezi

Literatüre göre farklı hücre tiplerinden köken alan eksozomlar, hatta aynı hücre tipinden türevlenen farklı eksozomlar farklı mekanizmalar ile üretilebilmektedir. Eksozom biyogenezi;

1. ESCRT'ye bağlı olarak
2. Alix-syntenin1-syndecan mekanizması ile
3. Tetraspaninlere bağlı olarak
4. Lipide bağımlı mekanizma ile gerçekleşebilir.

ESCRT'ye bağımlı ve ESCRT'den bağımsız eksozom biyogenezi şekil 13'te özetlenmiştir. Abel ve Breakefield (2016), Antimisiaris ve ark.(2018), Colombo ve ark. (2013), Grunathan ve ark.(2019), Hessvik ve Llorente (2018), Jan ve ark.(2019), Kim ve ark.(2018), Li ve ark.(2019), Willms ve ark.(2018)'e göre; ESCRT'ye bağlı eksozom biyogenezi şu şekilde gerçekleşmektedir: Plazma membranının invaginasyonu (hücre içine çökmesi) sonucu *erken endozomlar* oluşur. Erken endozomun membranı içe doğru tomurcuklanarak *intraluminal vezikülleri* (ILV'leri) oluşturur. ILV'ler oluşurken sitozolik proteinler, nükleikasitler ve lipidler bu küçük veziküller içerisine seçilerek yerleştirilir. Çok sayıda ILV içeren bu endozoma *geç endozom* ya da *multiveziküler cisim* (MVB) denir. Oluşan MVB'ler, içerdikleri moleküller parçalanacaksa lizozomla kaynaşır. Fakat içerdikleri ILV'ler eksozom olarak hücre dışına salgılanacaksa plazma membranı ile kaynaşır.



Şekil 13. ESCRT'ye bağlı ve ESCRT'den bağımsız eksozom biyogenezi (Kim ve ark, 2018'den alınma)

ILV'ler oluşurken 2 farklı işlem gerçekleşir:

1. Endozom membranı tetraspaninler bakımından oldukça zenginleşecek şekilde yeniden düzenlenir.

2. Erken endozom oluştuktan sonra, ESCRT kompleksleri sırasıyla endozom membranının sitozole bakan tarafına toplanırlar. Endozomal membran proteinlerinin sitozolik kuyrukları ubikutine edilir. Böylece ESCRT-0 uyarılır. ESCRT-0, endozomal membranın dışındaki ubikutinlenmiş bu proteinleri tanır ve endozomal membrana gelir. ESCRT-0 kompleksinin Hrs alt biriminin FYVE domaini endozomal membranın fosfatidilinositol 3-fosfat(PI3P) bakımından zengin bölgelerine bağlanır ve ESCRT-0 kompleksinin Hrs ile STAM1/2 alt üniteleri ubikutinlenmiş kargoları tanır ve bağlayarak endozomal membrana çeker. ESCRT-0'ın Hrs alt biriminin C terminalindeki bir domain ESCRT-I kompleksinin Tsg101'ini bölgeye çeker. ESCRT-I de ESCRT-II'yi bölgeye çeker. ESCRT-I ve II, erken endozom membranının içeri doğru tomurcuklanmasını indükler. Tomurcuklanma sırasında ubikütin ile etkileşim domainlerine sahip oldukları için, ESCRT-0'a bağlı ubikutinlenmiş kargoları ve yükleme sisteminin seçtiği diğer kargoları tomurcuk içine yerleştirir. ESCRT-I daha sonra ESCRT-II ya da ESCRT'ye yardımcı bir protein olan ALIX sayesinde ESCRT-III'ü bölgeye çeker. ALIX hem

ESCRT-I'in Tsg101 proteinini hem de ESCRT-III'ün CHMP4A proteinini kendine bağlar ve ESCRT-I ve ESCRT-III arasındaki ilişkide ara madde görevi görür. ESCRT-II, ESCRT-III'ün CHMP4 komponentini bölgeye toplanması için aktive eder. Bölgeye gelen CHMP6 komponenti ESCRT-II'ye bağlanır. ESCRT-III, ESCRT-0 ile bağlı kargoları birbirinden ayıran enzimleri bölgeye toplar. ESCRT-III kompleksinin CHMP4 proteini, oluşan tomurcuğun boynu etrafında bir bobin gibi polimerize olarak vezikülü büzer ve membrandan ayrılmasını sağlar. Daha sonra ESCRT-III kompleksi bir ATPaz olan Vps4 kompleksi tarafından membrandan sökülür.

Eğer bir eksozom ESCRT'ye bağımlı bir mekanizma ile üretiliyorsa, öncelikle bu eksozomların membranı tetraspanin bakımından zenginleşecek şekilde yeniden düzenlenir. Dolayısıyla bu eksozomların membranlarında tetraspaninler farklı kombinasyonlarda bulunabilir. Bu mekanizma sırasında görev yapan ESCRT-I kompleksinin Tsg101 alt biriminin de eksozom membranında bulunması bekleniyor. Dolayısıyla tetraspaninler ve TSG101 eksozomlarda bulunabildiği için bu proteinlere spesifik antikorlar bu çalışmada eksozom varlığının doğrulanması için kullanılmıştır.

4.3.3. Eksozomların fonksiyonları ve inflamasyondaki rolü

Eksozomlar ilk keşfedildiklerinde sadece hücresel homeostasi için ihtiyaç duyulmayan ya da lizozomal yıkıma dirençli molekülleri hücreden uzaklaştırmakla görevli yapılar olarak kabul edilseler de, daha sonra yapılan çalışmalar eksozomların hücreler arası iletişimde ve böylece çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer aldıklarını ortaya çıkarmıştır (Kim ve ark, 2018; Denzer ve ark. 2000).

Hücreler; salgıladıkları eksozomlar aracılığıyla proteinler, nükleik asitler, lipidler ve metabolitlerden oluşan biyoaktif bir kargoyu göndererek birbirlerine mesaj iletebilirler (Berumen Sanchez ve ark, 2021). Hücreler tarafından salgılanan bu eksozomlar, alıcı hücreyi hedeflemelerine izin veren yüzey molekülleri taşır (Tkach ve Thery, 2016). Hedef ya da alıcı hücreye bağlandıktan sora eksozomlar, şekil 13'te gösterildiği gibi hücreyi farklı şekillerde etkileyebilir: Eksozom yüzeyindeki transmembran ligandları, doğrudan alıcı hücre üzerindeki yüzey reseptörlerine bağlanarak *downstream* sinyallemeyi tetikleyebilir (Gurung ve ark, 2021). Ya da eksozomlar endositoz yolaklar aracılığıyla veya doğrudan alıcı hücrenin plazma

membranı ile füzyonu yoluyla proteinler, mRNA'lar ve mikroRNA'lar (miRNA'lar) gibi biyoaktif kargo moleküllerini alıcı hücrenin sitozolüne verebilirler ve alıcı hücrenin fizyolojik durumunu modifiye edebilirler (Tkach ve Thery, 2016; Kim ve ark, 2018; Gurung ve ark, 2021).

Eksozom kargolarından mRNA ve miRNA gibi genetik materyaller alıcı veya hedef hücrelerde translasyona uğrayabilir ya da gen ekspresyonunu regüle edebilir, transkriptomu değiştirebilir, alıcı hücreyi yeniden programlayabilir (Piszczatowska ve ark, 2021). Bu yolla ya da taşıdıkları kemokin, sitokin veya diğer sinyalleme molekülleri ile alıcı hücreyi uyararak antijen sunumu, immün regülasyonu (bağışıklığın aktive edilmesi ya da baskılanması), hücre farklılaşması, hücre göçü, nörobiyolojik fonksiyonlar ve sinaptik plastisite, doku yenilenmesi, anjiyogenik/anti-anjiyogenik etkiler gibi normal fizyolojik süreçlerde yer alabilir (Kim ve ark, 2018).

Artan kanıtlar, eksozomların fizyolojik olduğu kadar patolojik koşullarda da hücrelerarası iletişimde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Eksozomların inflamatuvar süreçlere ve immün tepkilere aracılık etmedeki rolü iyi belgelenmiştir (Piszczatowska ve ark., 2021). Farklı hücre türleri tarafından salgılanan eksozomlar, bağışıklık sisteminde görevli hücreler üzerinde pleotropik etki (hem etkinleştirici hem de baskılayıcı etki) gösterirler (Cihankaya ve ark, 2022). Bu nedenle immün yanıtın düzenlenmesinde ve homeostazında da görev alırlar. Örneğin; tümör hücrelerinden salgılanan eksozomlar, yüzeylerindeki CD95 proteini sayesinde, T lenfositlerinin programlı ölüme girmesine neden olurken, miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin oluşmasını tetikleyebilirler (Kahraman ve ark, 2014). Ayrıca, astrosit hücresinden köken alan glioblastoma hücrelerinin salgıladıkları eksozomlar içindeki mRNA, hedef hücre olan beyin endotel hücrelerinde proteine dönüştürülür (Kahraman ve ark, 2014). Böylece tümör hücresi kendisi için bir mikroçevre oluşturur. Dolayısıyla eksozomlar, kanserin oluşumunda ve gelişiminde de etkilidir. Kanser hücreleri ve komşu stroma hücreleri arasındaki etkileşim proliferatif ve anjiyogenik sinyallemenin uyarılması, immün baskının progresyonu ve pre-metastatik nişlerin başlaması yoluyla kanser gelişimini teşvik edebilir (Kim ve ark, 2018).

Öte yandan, eksozomların kargosu ana hücrelerini yansıttığından, hasarlı ve disfonksiyonel doku ortamlarından türetilen eksozomlar çeşitli hastalıkların ve patolojik durumların moleküler mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik bol miktarda bilgi sunabilir (Berumen Sanchez ve ark, 2021). Bu nedenle, eksozomal RNA ve proteinler beyin kanseri, nörodejeneratif hastalıklar ve bir dizi başka bozukluk için yeni nesil biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Li ve ark,2014). Örneğin, Smith ve ark. (2008), hastalığın varlığı ile korelasyon gösteren, tedavi ile azalan, kaynak dokudan idrara kadar izlenebilen ve beyin tümörlerinin varlığını tahmin eden bir üriner protein belirteç paneli bildirmişlerdir. Junn ve Mouradian (2012), Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklarda miRNA profilleme çalışması yapmışlardır. Araştırmacıların analizleri, belirli miRNA'ların değiştirilmiş ekspresyonunu göstermektedir. Bu da, bu hastalıkların gelişimini ve ilerlemesini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek çok önemli bir düzenleyici role sahip olabileceğini ve biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Zetterberg ve ark. (2013), başı sarsıcı darbeler ile ilişkili hasarı değerlendirmek için çeşitli vücut sıvılarından bir dizi RNA ve protein biyobelirteci tanımlamıştır.

Eksozomların etkili iletişimci olarak önemine ilişkin çok sayıda kanıt birikiyor olsa da, patolojik durumların gelişimindeki rolüne ilişkin çok daha az sayıda çalışma yapılmıştır (Berumen Sanchez ve ark, 2021). Bu nedenle, bu çalışma, inflamatuvar bir hastalık olan AS sürecinde eksozom profilinin (eksozom yoğunluğunun, kökeninin ve sitokin profilinin) nasıl değiştiğini ortaya koymayı hedeflemektedir. Böylece eksozom profiline göre hastalık ve seyrine ilişkin bir çıkarım yapılıp yapılamayacağı incelenecektir.

4.3.4. Eksozom izolasyonu

Eksozomları izole etmek için literatürde,

1. Yoğunluk farkına dayanan (santrifügasyon)
2. Boyut farkına dayanan (SEC, ultrafiltrasyon)
3. Çöktürmeye dayanan (polimer çöktürme, protein organik solvent çöktürme)
4. Afiniteye dayanan (EV proteinlerine karşı antikor kullanarak)

izolasyon yöntemleri yer almaktadır.

Bu araştırmada, önce eksozomların fiziksel özelliklerinden yararlanarak santifüj ve boyut dışlama kromatografisi (SEC), daha sonra biyokimyasal özelliklerinden yararlanarak afiniteye dayalı izolasyon yöntemi kullanılmıştır.

Santrifüj (Santrifügasyon): Santrifugal kuvvetlerin (yerçekimi kuvvetinin ve merkezkaç kuvvetinin) binlerce katı büyüklükteki çekim alani etkisinde kalan süspansiyon içindeki komponentlerin kütle, yoğunluk ve boyut farklılıkları nedeniyle farklı hızlarda çökelmesidir. Daha ağır, yoğun ve büyük komponentler daha hızlı çökelirler ve bu komponentlerin çökelmesi için daha düşük santrifüj kuvveti yeterlidir. Ağırlığı, yoğunluğu ve büyüklüğü azaldıkça komponentlerin çökelmesi için daha büyük santrifüj kuvvetlerine ihtiyaç vardır.

Boyut Dışlama Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography-SEC): Biyolojik örnek içerisindeki komponentleri büyüklükleri/boyutları ve şekilleri arasındaki farklara dayanarak ayırma yöntemidir. Bu yöntemde, bir kolon içerisine küçük çaplı gözenekler içeren polimer boncuklar yerleştirilerek sabit/durgun bir faz oluşturulur. Biyolojik örnek sütuna yüklenir. Daha sonra, sabit fazla birbirine karışmayacak olan bir tampon (genellikle PBS) eklendikçe, sütun boyunca akan böylece biyolojik örnek içindeki komponentleri sabit faz içerisine doğru çeken hareketli (mobil) bir faz oluşturulur. Kolonun üst kısmından mobil faz eklendikçe, biyolojik örnek sabit fazın içerisine girer. Biyolojik örnek içindeki çapı gözenek çapından daha küçük olan komponentler gözeneklerin içerisine difüze olurken, çapı gözenek çapından daha büyük olan komponentler gözeneklerin içerisine girmeden durgun fazı oluşturan boncukların arasındaki boşluklardan geçerek kolondan ayrılır. Böylece küçük çaplı komponentler ile büyük çaplı komponentlerin hareket hızları arasında fark yaratılır. Küçük komponentler daha yavaş hareket ettikleri için biyolojik örnekten geç ayrılırlar. Bu nedenle, kolondan en son elde edilen süzüntü (filtrat) içerisinde en küçük moleküller bulunur.

Eksozomların saflaştırılmasında bir aşama olarak SEC yöntemi kullanılabilir. Fakat bunun için, önce biyolojik örneğin *santrifüj* veya *filtrasyon* işlemlerinden geçirilerek örnek içindeki eksozomlardan daha büyük boyutlardaki komponentlerin (hücrelerin, hücre kalıntılarının, büyük EV'lerin, büyük proteinlerin) ayrılması ve eksozomları (ve eksozomlardan daha küçük boyuttaki proteinleri) içeren preparatın elde edilmesi

gerekir. Daha sonra SEC yöntemi ile bu preparat içindeki eksozomlar, proteinlerden hidrodinamik yarıçaplarındaki farklılık yardımıyla ayrılabilir. Eksozomların hidrodinamik yarıçapı proteinlerin hidrodinamik yarıçapından daha büyük olduğu için statik faz içindeki gözeneklere giremezler ve kolondan proteinlere göre daha önce ayrılırlar.

Afiniteye Dayalı İzolasyon yöntemi: Eksozomların yüzeyi üzerinde proteinler, karbonhidratlar ve lipidler bulunmaktadır ve bunlar antikorlar, lektinler ve lipit bağlayıcı proteinler gibi ligandlar ile karakteristik olarak etkileşime girebilirler (Cvjetkovic, 2019). Bu nedenle eksozomların yüzeyinde bulunan moleküller ile bunların ligandları arasındaki bu karakteristik etkileşimden yararlanarak biyolojik bir numune içindeki eksozomlar izole edilebilir (Popovic ve Marco, 2018). Bunun için, eksozomların yüzeyinde bulunan moleküllere karakteristik bağlanma eğilimi gösteren ligandlar manyetik boncuk, ELISA plakaları gibi sabit katı bir yüzey üzerine sabitlenir (Cvjetkovic, 2019). Bu yöntemde genellikle streptavidin ile kovalent olarak kaplanmış manyetik boncuklar kullanılır ve bunlar herhangi bir biyotinlenmiş yakalama antikoruna yüksek çekim kuvveti ile bağlanabilir (Grunathan ve ark.2019). Manyetik boncukları kullanan immünoaffinite metotları, daha büyük yüzey alanı ve homojene yakın yakalama işlemi sayesinde diğer mikroplakaya dayalı yaklaşımlara göre daha yüksek yakalama verimliliğine ve daha yüksek hassasiyete sahiptir (Grunathan ve ark, 2019). Li ve ark, 2017'ye göre, bu yöntemin başarılı olabilmesi için,

1. Katı yüzey üzerinde sabitlenen ligand ile etkileşecek olan eksozomal belirtecin membrana bağlı olması, çözünebilen muadillerinin olmaması, sadece hedeflenen eksozom alt popülasyonunda sentezlenmesi ya da hedef alt popülasyon üzerinde yüksek oranda yoğunlaştırılması gerekir.
2. Öncesinde hücrelerin eliminasyonu (ortadan kaldırılması) gibi bazı hazırlayıcı işlemlerin yapılması ve bazı durumlarda numunenin konsantre edilmesi gerekir.

4.3.5. Eksozom karakterizasyonu

Bazı hastalıkların farklı evrelerinde eksozomlar boyut, konsantrasyon ve kargo bakımından farklılık gösterdiği için, eksozomların bu karakteristikleri hastalığın

tanısı ve progresyonu için potansiyel bir belirteç olarak kullanılabilir. Bu nedenle eksozomların fiziksel ve kimyasal analizini yapmak önemlidir. Eksozomların fiziksel analizi ile spesifik eksozomların konsantrasyonu, boyutu ve boyut dağılımı, morfolojisi, elektrik direnci, elektroforetik mobilitesi, membran sertliği, kırılma indisi gibi özellikleri; biyokimyasal analizi ile filtratın saflık derecesi, eksozomların orjinlendiği hücre tipleri, belirli bir hücre tipinden türevlenen spesifik eksozomal alt popülasyonlarının varlığı/yokluğu, eksozom biyogenezi, yapısı ve fonksiyonu, hastalıkların tanısı için kullanılabilecek potansiyel eksozomal biyobelirteçler belirlenmeye çalışılır (Coumans ve ark, 2017).

Eksozomların fiziksel karakterizasyonu için;

1. Sabitlenmiş eksozomların yüksek çözünürlüklü görüntülenmesini sağlayan elektron mikroskobu (SEM, TEM, Cryo-TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi direkt yöntemler,
2. Eksozomların boyutu ve konsantrasyonunu difüzyon/hareket yörüngeleri, ışıkla etkileşimleri, bir dedektör içindeki elektrik akımı üzerindeki etkileri gibi optik veya elektriksel okumalar ile gözlemlenebilecek özelliklerini kullanarak tahmin eden NTA (Nanoparticle Tracking Analysis/nanoparçacık izleme analizi), DLS (Dynamic Light Scattering/dinamik ışık saçılımı), FC (Flow Cytometry/akış sitometrisi) ve RPS (Resistive Pulse Sensing/dirençli darbe algılama) gibi dolaylı yöntemler kullanılabilir (Wu ve ark, 2015).

Eksozomların biyokimyasal karakterizasyonu için ise immünoblotlama, immünosorbent EV testleri veya standart kolorimetrik protein tahlilleri yapılabilir.

- İmmünoblotlama, öncelikle eksozomların proteinlerini serbest bırakması için lizis edilmesini, ardından bir membran üzerinde doğrudan spotlamayı ya da SDS-PAGE kullanarak proteinlerin ayrılması ve ilgilenilen proteini hedefleyen etkili antikorlar kullanarak saptamayı (western blot) içerir (Hartjes ve ark, 2019).
- İmmünosorbent EV testi, eksozom membran proteinlerine karakteristik antikorlarla kaplı manyetik boncuk gibi destekleyici bir yüzey üzerinde spesifik eksozomların yakalanmasını içerir (Hartjes ve ark, 2019).

- Ayrıca, eksozomal total protein konsantrasyonu Bisinkoninik Asit (BCA) ya da Bradford yöntemi gibi kolorimetrik yöntemlerle ölçülebilir.

Bisinkoninik Asit (BCA) Yöntemi: Literatürde, EV konsantrasyonu çoğunlukla NTA gibi ışık saçan teknolojiler yoluyla, büyük EV'ler için standart flow sitometri, daha küçük EV'ler için yüksek çözünürlüklü flow sitometri yoluyla ya da RPS, cryo-EM gibi yöntemlerle belirlenmektedir (Thery ve ark, 2018). Fakat EV konsantrasyonunu doğrudan ölçebilen ve etkililiği ve verimliliği üzerinde fikir birliği sağlanmış bir yöntem mevcut değildir (Koritzinsky ve ark,2017). Mevcut kantifikasyon yöntemlerinin hiçbiri, EV'lerin heterojenliği nedeniyle, mutlak olarak gerçek eksozom konsantrasyonunu ortaya koyamamaktadır. Bu nedenle, EV üzerine yapılan son çalışmaların çoğu EV kantifikasyonu için tamamlayıcı yaklaşımlar kullanmaktadır (Hartjes ve ark, 2019): EV partikül sayısını tespit etmeye çalışan NTA, flow sitometri, RPS, cryo-EM gibi yöntemler eksozomların içerdiği biyomoleküllerin kantifikasyonu ile desteklenmektedir. Eksozomal protein kantifikasyonu için kullanılabilen BCA yöntemi de bu nedenle önemlidir. Protein miktarı, ayrıca, kullanılan izolasyon yönteminin verimliliğini saptamak için bilinmesi gereken önemli bir ölçüdür.

BCA yöntemi, protein çözeltisinin bir belirteçle reaksiyonu sonucunda oluşan renkli bir bileşiğin (kromofor) görünür alanda spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır (Arda ve Ertan, 2017). Duyarlılık sınırı 20-2000ug/ml olan BCA yönteminde önce Cu^{+2} iyonları, alkali ortamdaki proteinler tarafından Cu^{+1} iyonlarına indirgenir; daha sonra oluşan Cu^{+1} iyonları bisinkoninik asit (BCA) içeren çok duyarlı ve seçici bir belirteçle kolorimetrik olarak saptanır (Otieno ve ark, 2016). İki molekül BCA bir Cu^{+1} iyonu ile morumsu renkte suda çözünen bir kompleks oluşturur ve bu kompleks protein derişimi ile orantılı olarak 562 nm'de güçlü bir absorbans ortaya koyar (Arda ve Ertan,2017).

Flow Sitometri (FC) Yöntemi: Akan bir sıvı içindeki biyolojik partiküllerin boyut, şekil, DNA, RNA içeriği, stoplazmik granülaritesi gibi fiziksel ve kimyasal karakteristiklerinin ölçülmesidir (Kanev ve Muranlı, 2016; McKinnon, 2018). Numune içindeki eksozom, membranı üzerinde bulunan bir proteine bağlanma eğilimi gösteren ve floresan bir madde (florofor) ile etiketli spesifik bir antikorla

işaretlenir. Spesifik bir dalga boyuna sahip bir lazer ışını, içerisinde asılı halde işaretli eksozomları içeren ve akmakta olan numuneye yönlendirilir (Grunathan ve ark, 2019). Böylece eksozomlar lazer ışını içinden birer birer geçer ve bunun sonucunda,

- Solüsyon ile aralarındaki kırılma indisi farkı nedeniyle üzerine düşen ışını saçar.
- Ya da florofor, ışığı absorbe eder. Bu durum floroforun elektronlarının uyarılmasına neden olur. Uyarılan elektronlar, emilen ışığı daha uzun dalga boyunda yeniden yayarak temel haline geri döner.

Saçılan ışın ya da yayılan floresan sinyallerinin yoğunluğu, ölçüm kanallarında ayarlanan eşiği aştığında çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak fotodedektörlere aktarılır (Coumans ve ark, 2017). Fotodedektörler ise floresan ışınını elektrik sinyaline dönüştürüp analiz için bilgisayara aktarır. Böylece biyolojik partiküle bağlı antikorun yaydığı floresan yoğunluğu ölçülerek biyolojik partikülün fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenir (Kanev ve Muranlı, 2016).

Flow sitometri 300 nm'den daha büyük partikülleri ölçebilir (McKinnon, 2018). Fakat eksozomlar küçük boyutları ve solüsyon ile aralarındaki küçük kırılma indisi farkı nedeniyle çok daha az ışık yayar (Grunathan ve ark,2019). Yayılan ışık, eşiği aşamayacağı için dedektörler tarafından saptanamaz. Bu nedenle eksozomlar, flow sitometri analizinden önce, eksozomal membran proteinlerine karakteristik antikorla kaplı manyetik boncuklar kullanılarak yakalanmalıdır.

Öte yandan flow sitometri ile yapılan analiz, EV'lerle benzer biyofiziksel karakteristiklere sahip olan ve ileri ve yan saçılan ışık yoğunluklarında dalgalanmalara neden olacak olan –numune içindeki diğer kompleksler- tarafından bozulabilir (Kurian ve ark, 2021). Bu nedenle, çalışılacak olan numunenin saflık derecesi önemlidir. Eksozomun flow sitometrik ölçümündeki diğer bir sınırlama, yığın etkisidir (Kurian ve ark, 2021). Eksozomlar lazer ile aynı anda aydınlatıldığında, birden fazla eksozomun saçtığı ışık tespit limitinin üzerine çıkabilir ve toplu olarak tespit edilebilir (Gurunathan ve ark, 2019). Böylece birden fazla eksozom, hatalı veri yorumlamasına neden olan daha büyük tek bir olay olarak sayılabilir. Yığın etkisi sorunun üstesinden gelmek için, filtrat, seri diüsyonlar içinde analiz edilir. Ayrıca, antikorlar hedeflenen proteinle aynı epitopu taşıyan başka bir

proteine bağlanabilir. Bu nedenle, membranın heterojenliği ve eksozom kargo kompozisyonu saçılan floresan yoğunluğunu etkilemekte ve boyut ve konsantrasyon tahminlerinde hatalara neden olabilmektedir (Gurunathan ve ark, 2019).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Çalışma Tasarımı

İlaç dışı klinik bir araştırma olan bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından Şubat 2019'da onaylanmıştır (protokol kodu: 09.2019.166). Tek merkezli, iki kollu olan bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve İç Hastalıkları AD-Romatoloji Bilim Dalı tarafından Şubat 2019 – Ağustos 2020 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

5.2. Çalışma Grupları

Bu çalışmanın örneklemini, çalışmaya katılmayı kabul eden ve bilgilendirilmiş onam formunu doldurarak imzalamış olan 29-60 yaş arası 10 AS hastası ile aynı yaşlar arasındaki sistemik enflamasyonu olmayan 10 sağlıklı kontrol, toplamda 20 katılımcı oluşturmaktadır. Hastaların 4'ü hafif seyirli (mild AS, %40), 6'sı ise şiddetli (severe AS, %60) AS hastalarıdır. Hasta ve sağlıklı grubun biri kadın (%10), diğerleri erkektir (%90). Söz konusu hafif seyirli ve şiddetli AS hastaları ve sağlıklı kontrol grubu aşağıda detaylı olarak tanımlanmaktadır.

Şiddetli Ankilozan Spondilit Hasta Grubu: En az 6 en çok 10 olmak üzere ASAS ve New York Çalışma Grubu kriterlerini karşılayan, >4 BASDAI skoru olan, yeni tanı alan veya NSAİD'e yanıt vermeyen, 29-60 yaşları arasındaki gönüllü hastalar.

Hafif Seyirli Ankilozan Spondilit Hasta Grubu: En az 6 en çok 10 olmak üzere ASAS ve New York Çalışma Grubu kriterlerini karşılayan, <2.8 BASDAI skoru olan, en az 2 yıl en fazla NSAİD alan, 29-60 yaşları arasındaki gönüllü hastalar.

Sağlıklı Kontrol Grubu: Tanılı bir otoimmün/otoinflammatuar hastalığa veya bu hastalıkların klinik özelliklerine sahip olmayan, güncel değerlendirmede herhangi bir nedenle immunsupresif tedavi almayan, 29-60 yaşları arasındaki gönüllü bireyler.

Çalışmaya katılan hasta ve sağlıklı gönüllülerin genel ve klinik özellikleri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Hasta ve sağlıklı gönüllülerin klinik özellikleri

	AS (n=10)	mAS (n=4)	sAS (n=6)	SK (n=10)
Yaş (ortalama±SS)	41.3±9.51	35.5 ± 7.68	45.17 ±9.09	40.08±7.19
Cinsiyet (erkek/kadın) (%)	90/10	75/25	100/0	90/10
BASDAI skoru (ortalama±SS)	4.16±1.71	2.3 ±0.37	5.40 ±0.68	-
Yorgunluk seviyesi (ortalama±SS)	4.2±2.29	2.25 ± 1.26	5.50 ± 1.87	-
Boyun, sırt, bel ve kalça ağrısının düzeyi (ortalama±SS)	6.1±3.14	2.75±0.96	8.33±1.50	-
Diğer eklemlerde ağrı/şişme düzeyi (ortalama±SS)	5.6±2.95	2.25 ±0.5	7.83±0.75	-
Dokunmaya duyarlı alandaki rahatsızlık düzeyi (ortalama±SS)	4.80±2.44	2.25±1.25	6.50±1.05	-
Sabah tutukluluğu seviyesi (ortalama±SS)	5.1±2.33	2.5±0.58	6.83±0.75	
Sabah tutukluluğu süresi (ortalama±SS)	2.9±1.52	1.5±0.57	3.83±1.17	

AS: Ankilozan Spondilit, mAS: hafif seyirli AS, sAS: şiddetli AS, SK: sağlıklı kontrol, BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, SS: standard sapma

5.3. Araştırmada İzlenen Yöntem ve Kullanılan Gereçler

Bu araştırmada, öncelikle, çalışmanın popülasyonunu oluşturan her iki gruptaki toplam 20 katılımcıdan onam formu imzalatıldıktan sonra alınan periferik kan örneklerinden kan serumu elde edilmiştir. Serum içerisindeki EV'ler önce santrifüjleme ve SEC yöntemi ile ardından afiniteye dayalı izolasyon yöntemi ile serumdan ayrılarak EV bakımından zengin filtrat elde edilmiştir. Filtratın saflık derecesini belirlemek için BCA ve ELISA analizleri yapılmıştır. Öncelikle, BCA *(liziz-)* analizi ile serum ve filtratın total protein konsantrasyonu karşılaştırılmıştır. Uluslararası Hücredışı Veziküller Derneği *(ISEV)* 2018'e göre filtratın saflığı; EV'lerle birlikte izole olabilen fakat EV'lerde bulunması beklenmeyen ve serumun büyük bir çoğunluğunu oluşturan apolipoprotein A1/2 ve B, albümin gibi proteinlerin

miktarlarının daha az olduğu ya da hiç bulunmadığı gösterilerek belirlenebilir. Bu nedenle BCA *(liziz-)* sonuçlarını desteklemek amacıyla, serum ve filtrat içindeki albumin miktarı sandwich ELISA yöntemi ile ölçülmüş ve elde edilen değerler BCA *(liziz-)* sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

AS sürecinde eksozom profilini ortaya koymak amacıyla BCA *(liziz+)* ve FC analizi yapılmıştır: Filtrattaki eksozomların varlığını doğrulamak ve eksozom konsantrasyonundaki değişimi, eksozomların kökenini ve sitokin profilini belirlemek için FC analizi ile eksozom yüzey belirteçleri karakterize edilmiştir. Ayrıca, eksozom yoğunluğu ile ilgili FC bulgusunu desteklemek amacıyla, AS sürecinde eksozom konsantrasyonundaki değişim BCA *(liziz+)* yöntemi ile test edilmiştir. Bunun için AS ve SK gruplarından elde edilen filtrat içindeki total eksozomal protein konsantrasyonu BCA *(liziz+)* analizi ölçülmüş ve sonuçlar, FC sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Ayrıca yöntem hakkında bilgi edinmek (inkübasyon süresi ve liziz işleminin BCA üzerindeki etkisini değerlendirmek) için, liziz işleminin yapıldığı ve yapılmadığı iki ayrı BCA'da 30 ve 90 dakikalık iki ayrı inkübasyon gerçekleştirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Tüm araştırma süresi boyunca aşağıdaki gereçler kullanılmıştır:

- $qEV_{2/35nm}$ (2 paket/4 kolon) (Izon Science, SP8)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 500 ml (Thermo Scientific, 23227)
- Human Albumin Elısa Kit (Abcam, ab227933)
- ExoCap Streptavidin CD9/CD63/CD81 Kit (MBL, MEX-SA)
- Antikorlar
  - TSG101/FITC: sc7964 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)
  - CD3/PE-Cy7: 300420 (Biolegend, San Diego, CA, USA)
  - CD86/PE-Cy7: 374210 (Biolegend, San Diego, CA, USA)
  - IL-17A/PE: IC3171P (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
  - IL-12/IL-35(p35)/PE: IC2191P (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
  - TNFα/PE membrane form: FAB210P-025 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

- Mouse IgG2a(k)/FITC: 11-4724-82 (Thermofisher, Agawam, MA)
- Mouse IgG1(k)/PE-Cy7: 25-4714-42 (Thermofisher, Agawam, MA)
- Mouse IgG1(k)/PE: 12-4714-81 (Thermofisher, Agawam, MA)
- IFNγ/PE: 855.002.019 (Diaclone, Besancon, France)

- Flow sitometri Cihazı (BD Facs Calibur)
- Santrifüj cihazı
- Vakumlu Tüp - 8,5 Ml. Jelli - B.D. - Sarı Kapaklı - 100 Adet (Tks-Web, 406007448)
- Vakumlu İğne Ucu - Bd - Yeşil - 100 Adet (Tks-Web, 406007451)
- Otomatik Turnike Standart (Tks-Web, 109007719)
- Tüp Standı - Tüp Sporu - 60 Delikli - 16 X 100 Tüpler İçin – Mavi (Rodus 8523)
- Tüp Standı - Katlanır 12 - 13 Mm (Tıpkimsan; 809007217)
- Cam Tüp -Santrfüj-Dibi Konik - Derecelı 16 X 100 – Adet (interlab/ Isolab, 401005135)
- Holter / Holder (Tks-Web,406007453)
- Nitril Eldiven - Haspet - Medium - 100 Adet (Has-Pet,118007945)
- Pamuk 50 Gram (Tks Web, 101077434)
- Eppendorf Tüpler İçin Tüp Standı - Saklama Kutusu -100 Tüplük (Tıpkimsan, 809007220)
- Eppendorf Tüpü -0.5 Ml - 500 Adet (İnterlab/Isolab, 402005184)
- Eppendorf Tüpleri İçin Tüp Standı - Üç Katlı (Tıpkimsan; 809007224)
- Santrfüj Tüpleri - Mikro - Kilitli Kapaklı - Hacim: 5 Ml (400 Adet)- Sterilite: Steril **(**İnterlab/ Isolab, 07805022)
- Stant Abs-175X300mm **(**İnterlab/ Isolab, 04904175)
- Kıskaç - 3 Çeneli - Nivolu (İnterlab/Isolab, 04506001)
- Pipet Uçları - Yüksek Hassasiyet - Bilimsel Araştırmalar İçin - Hacim: 1000 Ml (96 Adet)- Sterilite: Steril- Filtre: Var- **(**İnterlab/Isolab, Tb010)
- Pipet Uçları - Yüksek Hassasiyet - Bilimsel Araştırmalar İçin - Hacim: 5000 Ml (50 Adet)-Sterilite: Steril - Filtre: Yok **(**İnterlab/Isolab, Tb010)

- Pipetler - Pastör - Cam - Uzunluk: 225 Mm (250 Adet) **(**İnterlab/Isolab, 08401001)
- Büyük Boy Pipet Puarı (İnterlab/Isolab, 01103001)
- PC/LDPE 0,5 ml Mikro tüp Kutusu (2 kutu) (Orlab) E5124.524060
- PC/LDPE 1,5 ml Mikro tüp Kutusu (2 kutu) (Orlab) E5124.524070
- U Plate 96 Kuyulu, Steril L120038 (Orlab)
- U-V Plate Kapağı, Steril L129938 (Orlab)
- Beher, Cam, Kısa Form, 250 ml C411007 (Orlab)
- Pipet Ucu, MAXIPENSE™, Ultra Low Retention, 96'lık Rakta, Steril, 1000 µl E526103 (Orlab)
- Pastör Pipeti, Hacim 3 ml, Uzunluk 150 mm, Taksimatlı, 26 damla/ml, 20 lik poşette steril (Orlab) L135038
- Naylon Rack, 1,5/2ml Mikro Tüp için, 96 Delikli, Mavi (Orlab) E241120
- Falkon Tüpü, PS, SPINWIN™, 15 mL, Rack, Steril E546110 (Orlab)
- Falkon Tüpü, PP, SPINWIN™, 50 mL, Ayakta durabilen, Steril E546043 (Orlab)
- PP Şişe, Sızdırmaz Kapak, Geniş Boyunlu, 100 ml L292261 (Orlab)
- Pipet Pompası (PI-PUMP), Plastik, 10 ml, yeşil H901002 (Orlab)
- Pipet Ucu, MAXIPENSE™, Ultra Low Retention, 96'lık Rakta, Steril, 200 µl E526101 (Orlab)
- Baget, Cam, 150x6 mm C490200 (Orlab)
- PROMOLAB® Ekonomik Termometre, Cıvalı, -20+110°C, Taks.1°C, TOT, 305 mm (Orlab) H550110
- Termometre, Alkollü -20+150°C, Taks.1°C, 305 mm (Orlab) H551150
- Beher, Cam, Kısa Form, 100 ml (2 adet) (Orlab) C411004
- Mezür-Uzun Form-50 ml (Orlab) C992504
- Serolojik Pipet, Plastik, Tek Kullanımlık, Pyrogen free, 5 ml 25'li poşette (Orlab) L160511
- Pipet Ucu, Filtreli, 96'lik Rakta, Steril, DNase, Rnase and Pyrogen free, Ultra Low Retention,200 µl (Orlab) E529104

5.3.1. Katılımcılardan kan alma işlemi

Olur formunu imzalayan 20 katılımcının kol venlerinden (sinirlere ve arterlere daha uzak olan medyal toplardamarından) 21 G iğne ucu ile sarı kapaklı jelli tüplere 8.5 ml (1 tüp) venöz kan örneği alınmıştır. Kanın tüpün çeperindeki silika partikülleri ile iyice temas etmesi için, tüp çalkalanmadan 5-6 kez yavaşça altüst edilmiş, tüp içindeki kan kendiliğinden pıhtılaşana kadar oda sıcaklığında ortalama 1 saat kadar beklenmiş ve 15 dakika boyunca 2500g'de farklı tüplerde iki defa santrifüj edilmiştir. Trombositleri çıkarmak için santrifüj işlemi iki defa gerçekleştirilmiştir. Santrifüjden sonra tüp dik tutularak bulandırmadan pastör pipeti ve mikropipet kullanılarak serum ayrılmış ve üzerinde katılımcı bilgileri yazılı olan ependorf tüplere aktarılmıştır. BCA analizi için 1,5 ml'lik tüplere 500-700 ul kadar, ELISA için 0,5 ml'lik tüplere 150-200 ul kadar ve flow sitometri analizi için 5 ml'lik ependorf tüplere 2,5 ml'lik serum konulmuştur. Trombosit ve lökosit kontaminasyon riskini azaltmak için son 0,5 cm'lik serum bırakılmıştır. Sonrasında, tüplerin tamamı saklama kutuları içerisinde -80˚C'de dondurulmuştur.

5.3.2. Serumdan eksozom izolasyonu

Serumdan 35nm-350 nm arasında boyuta sahip eksozom izolasyonu için, önce eksozomların fiziksel özelliklerinden yararlanan santrifüjleme ve SEC yöntemleri, ardından kimyasal özelliklerinden yararlanan afiniteye dayalı izolasyon yöntemi kullanılmıştır.

Izons Science'a ait $qEV_{2/35nm}$ kolonları (Christchurch, New Zealand) kullanılarak gerçekleştirilen SEC yönteminde, kolon filtrelerinin tıkanmasını önlemek için numuneler kolona yüklenmeden önce santrifüjlendi (10 000g'de 10 dakika). Kolon ve numune buffer'ı 18-24˚C'lik çalışma sıcaklığına getirildikten sonra bir labaratuvar standında kolonun dik bir şekilde kurulumu gerçekleştirildi. Önce kolon içindeki sodyum azidi çıkarmak için rezervuara 60 ml 1X Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (wisent, 311-425CL, St. Bruno, QC, Canada) yüklenip kolondan geçirildi. 2 ml'lik serum rezervuara yüklendikten hemen sonra -önce 16 ml void hacim, daha sonra başka bir tüpe 4,5 ml dilue edilmiş EV bakımından zengin filtrat- toplandı. Elde edilen filtratın bir kısmı BCA ve ELISA deneylerinde, bir kısmı ise FC analizinde kullanılmak üzere ayrı ependorf tüplere konuldu.

SEC ile elde edilen filtrattaki eksozomlar, ExoCap^{TM} Streptavidin CD9/CD63/CD81 kiti (MBL Life Science, Woburn, MA, USA, MEX-SA) kullanılarak hemen hemen her hücre tipinden türetilen eksozomların yüzeyinde bulunan tetraspanin antikorları CD9, CD63 ve CD81 ile kaplanmış 3 μm çapındaki manyetik boncuklarla yakalandı: Bunun için önce ExoCap Streptavidin CD9/CD63/CD81 kiti içindeki 3 um çapındaki magnetik boncuklar üreticinin talimatlarına göre CD9, CD63 ve CD81 antikorları ile kaplandı ve antikorla kaplı herbir boncuktan eşit miktarda alınarak bir kokteyl oluşturuldu. Sonra bu boncuk kokteyli kullanılarak filtrat içerisindeki eksozomlar üreticinin talimatlarına göre yakalandı. Kısaca, 2 ml'lik tüpün içerisine 12,5 ul antikorla kaplı boncuk kokteylinden konuldu. Daha sonra tüpe eksozomun spesifik olmayan bağlanmasını minimize etmek için 50 ul tampon (Treatment buffer) eklendi ve hafifçe karıştırılarak boncuklar tampon içinde iyice süspanse edildi. Daha sonra tüpe 50 ul filtrat eklendi. 24 saat boyunca oda sıcaklığında (23,5 ˚C'de) hafifçe karıştırılarak inkübe edildi. Son olarak magnetik stand üzerinde tutularak yıkama/seyreltme tamponu ile 2 kez yıkandı ve 250 ul boyama tamponu (staining buffer)(BD Biosciences, 554657, Wokingham, UK) içinde yeniden süspanse edildi.

5.3.3. Filtratın saflık derecesinin tespiti

SEC'e dayanan $qEV_{2/35nm}$ kolonlarıyla elde edilen filtratların saflığı BCA *(liziz-)* ve ELISA yöntemleri ile değerlendirildi.

İlk olarak, işlenmemiş serumun ve filtratın total protein konsantrasyonu Pierce^{TM} BCA Protein Test Kiti (Thermo Scientific, 23227, Agawam, MA) kullanılarak karşılaştırıldı. Öncelikle, üreticinin talimatlarına göre seyreltilmiş albumin (BSA) standartları ve BCA çalışma reaktifi hazırlandı. RIPA (radyoimmünopresipitasyon deneyi) liziz tamponu kullanılmadan ayrı plakalarda her numune için ikişer kuyucuk hazırlandı. Bunun için, bir mikroplakanın kuyucuklarına herbir standart ve numuneden 2 tekrar olacak şekilde 25 ul konuldu. Her kuyucuğa 200 ul BCA çalışma reaktifi eklendi. Mikroplakalar 37˚C'de 30 ve 90 dakika inkübe edildikten sonra 562 nm'de bir plaka okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı.

Ardından, işlenmemiş serum ve filtrattaki albümin konsantrasyonları sandviç ELISA yöntemiyle Human Albumin ELISA Kit (Abcam, ab227933, Cambridge, UK)

kullanılarak karşılaştırıldı. Bunun için, reaktifler (yıkama tamponu, antikor kokteyli, standartlar ve numuneler) üreticinin talimatlarına göre hazırlandı. Bir mikroplakanın kuyucuklarına tüm numune ve standartlardan 50 ul konulup her kuyucuğa 50 ul antikor kokteyli eklendi. Bir plaka çalkalayıcı (plate shaker) üzerinde oda sıcaklığında 1 saat inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. Her kuyucuğa 100 ul TMB substratı eklenerek karanlıkta bir plate shaker üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Son olarak 100 ul durdurma solüsyonu (stop solution) eklenerek 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

5.3.4. Eksozom konsantrasyonu ile AS arasındaki ilişki

AS süresince eksozom konsantrasyonundaki değişim, BCA *(liziz+)* yöntemine dayanan Pierce™ BCA Test Kiti (Thermo Scientific, 23227) ile AS ve SK filtratlarının toplam eksozomal protein konsantrasyonu ölçülerek değerlendirildi. Bunun için, 200 ul filtrat ve lizis tamponu (proteaz inhibitör kokteyli içeren RIPA tamponu; sc24948, Santa Cruz, Dallas, ABD) oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve her biri 5 saniye boyunca buz üzerinde üç kez sonikasyona tabi tutuldu. Daha sonra önceki BCA işlemleri tekrarlandı. Bunun için, üreticinin talimatlarına göre seyreltilmiş albümin (BSA) standartları ve BCA çalışma reaktifi hazırlandı. Bir mikroplakanın kuyucuklarına herbir standart ve numuneden 2 tekrar olacak şekilde 25 ul konuldu. Her kuyucuğa 200 ul BCA çalışma reaktifi eklendi. Mikroplakalar 37˚C'de 30 ve 90 dakika inkübe edildikten sonra 562 nm'de bir plaka okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı. Sonuçlar, AS sürecinde eksozom oranlarındaki değişimi doğrulamak amacıyla *FC sonuçları ile* ve yöntem (inkübasyon süresi ve lizizin etkisi) hakkında bilgi edinmek için *BCA (liziz-)* analiz sonuçları ile karşılaştırıldı.

5.3.5. Eksozom yüzeyindeki belirteçlerin FC analizi

Eksozom varlığını doğrulamak için ve eksozom yoğunluğundaki değişimi, eksozomların kökenini ve sitokin profilini belirlemek için FC analizi yapıldı.

Bunun için, arka planı (background) arttırmadan en yüksek sinyali üretebilecek optimal antikor konsantrasyonlarını belirlemek için, eksozom boyama işleminden önce antikor titrasyon deneyleri gerçekleştirildi. Bazı antikorlar için üreticinin tavsiye ettiği miktardan başlayarak, bazı antikorlar için ise üreticinin tavsiye ettiği

miktarın iki katından başlayıp gittikçe azalan miktarlarda antikor içeren beşer tüp hazırlandı. Negative kontrol olarak ise "boyanmamış (unstained) kontrol" ve ilgili antikorla aynı konsantrasyonda "isotype kontroller" hazırlandı. Asıl FC deneyinin yapılacağı koşullar altında hazırlanan bu tüpler BDFACSCalibur cihazı kullanılarak analiz edildi. Her konsantrasyon için staining index hesaplandı ve her antikor için maksimum staining indexi veren konsantrasyon belirlendi. Staining index belirlenirken aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Staining Index}=(MFI_{pos}-MFI_{neg})/2\sigma_{neg}$$

MFI_{pos}: Pozitif populasyonun ortalama floresan yoğunluğu
MFI_{neg}: Negatif popülasyonun ortalama floresan yoğunluğu
σ_{neg}: Negatif popülasyonun standart sapması

Kompanzasyonu yaparken;

- FL1, FL2 ve FL3 kanalları arasındaki "taşmayı (spillover)" hesaplayabilmek amacıyla deneyde kullanılan her floresan (ve antikor) için bir ***single stain kontrol,***
- Doğru kapılama (gating) yapabilmek amacıyla, tüm floroforlar ve antikorlar için ***Fluorescence Minus One (FMO)*** kontrolleri,
- Otofloresanın seviyesini belirlemek ve voltajları ayarlamak için ***boyanmamış (unstained) kontrol,***
- Non-spesifik bağlanmayı saptamak, gözlemlenen ışımanın spesifik bağlanmaya bağlı olduğundan emin olmak için deneyde kullanılan antikorla aynı konsantrasyonda, aynı florofora ve aynı IgG alt sınıfına sahip ***isotype kontroller*** kullanıldı.

Antikor titrasyonundan sonra, 250 µl eksozom solüsyonuna non-spesifik bağlanmayı minimize etmek için 12,5 µl Human TruStain FcX (Biolegend, 422302) eklenmiş ve 10 dakika inkübe edilerek Fc reseptörleri bloke edilmiştir. Daha sonra numuneler aşağıda verilen dört farklı antikor kokteyli ile etiketlenmiştir. 25 ul eksozom-boncuk kompleksi üzerine kokteyl içerisindeki antikorlardan uygun miktarlarda konuldu. Total hacim 100 ul olacak şekilde boyama tamponu (stain buffer) eklendi ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında hafifçe karıştırılarak karanlıkta inkübe edildi. Manyetik

stand üzerinde boyama tamponu (stain buffer) ile 3 kez yıkandı ve 250 ul stain buffer eklendi. Aynı işlemler izotip kontrol (IgG_{2a}(k)/FITC, IgG_1(k)/PE ve IgG_1(k)/PE-Cy7) tüpü için de gerçekleştirildi. Son olarak, her katılımcıya ait 4 antikor kokteyli ile etiketlenmiş eksozomların FC analizi, "unstained" ve "isotype" negatif kontrolleri kullanılarak BDFACSCalibur cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

a) Antikor kokteyli-1: $TSG101_{/FITC}$, $CD3_{/PE\text{-}Cy7}$, $IL\text{-}17_{/PE}$

b) Antikor kokteyli-2: $TSG101_{/FITC}$, $CD3_{/PE\text{-}Cy7}$, $IFN\text{-}y_{/PE}$

c) Antikor kokteyli-3: $TSG101_{/FITC}$, $CD86_{/PE\text{-}Cy7}$, $TNF\text{-}\alpha_{/PE}$

d) Antikor kokteyli-4: $TSG101_{/FITC}$, $CD86_{/PE\text{-}Cy7}$, $IL\text{-}12_{/PE}$

e) İsotype kontrolü: $IgG2a(k)_{/FITC}$, $IgG1(k)/_{PE}$, $IgG1(k)_{/PE\text{-}Cy7}$

Asıl FC deneylerinden önce, FC çalışmalarının gerçekleştirileceği koşulların optimizasyonu için, deneyler aynı katılımcılardan alınan numunelerle farklı koşullar altında iki defa tekrarlandı. Eksozomların boncuklara bağlanmasını teşvik etmek için numuneler ile boncuk kokteyli farklı sıcaklıklarda ve farklı sürelerde inkübe edildi. Benzer şekilde, antikorların eksozomlara bağlanabilmesi için yakalanan eksozomlarla antikor kokteylleri farklı sıcaklıklarda ve farklı sürelerde inkübe edildi ve sonuçlar karşılaştırıldı. Böylece asıl FC deneyinde uygulanacak sıcaklık değerleri ve inkübasyon süreleri belirlendi.

5.3.6. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS Statistics for Windows, sürüm 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., ABD) kullanılarak yapıldı. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Bir $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BCA ve ELISA bulgularının (tablo 6, 8 ve 9) normal dağılıma uygun olmadığı saptandı ve bu bulgular ortanca (minimum-maksimum) olarak sunuldu. Tablo 6 ve 9'da serum ve filtrat karşılaştırmaları ve 30. ve 90. dakikalarda serum karşılaştırması için Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı. Tablo 8 ve 9'da AS ve SK gruplarının

karşılaştırılmasında ve farklılığa neden olan grubun belirlenmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı.

FC bulgularından (tablo 11, 12, 13 ve 14) normal dağılım gösterenler *ortalama±SS,* normal dağılım göstermeyenler *ortanca (minimum-maksimum)* olarak sunuldu. Normal dağılım gösteren parametreler analiz edilirken AS ve SK grupları arasında karşılaştırma için Student t testi, hafif ve şiddetli AS ile kontrol grupları arasında karşılaştırma için Oneway ANOVA testi kullanılmış olup varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Farklılığa neden olan grubun tespitinde grupların varyansları homojen ise Post-Hoc Tukey HSD testi, homojen değil ise Tamhane's T2 testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametreler analiz edilirken AS ve SK gruplarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, hafif ve ağır AS ile kontrol gruplarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Etki büyüklüğü belirlenirken, iki grup arası karşılaştırmalarda Cohen's d, grup içi bağımlı örneklem için Hedges' g ve üç grup arası karşılaştırmalarda n^2 (Eta squared) değerleri hesaplandı.

Bu çalışmada katılımcıların genel ve klinik özellikleri ortalama, standart sapma ve yüzde kullanılarak tanımlanmıştır (tablo 5).

6. BULGULAR

6.1. BCA *(liziz-)* ve ELISA ile Saflık Tespiti

BCA *(liziz-)* analizi sonucunda, AS ve SK gruplarında, 30 ve 90 dk'lık inkübasyondan sonra, serum protein konsantrasyonunu filtratın protein konsantrasyonundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu ve güçlü etki büyüklüğü elde edildi (tümü için p_1<0,01 cohen's d>0,8 Tablo 6).

Tablo 6. BCA (liziz-) ile *filtrat ve serumun* saflık analizi

Her inkübasyon süresi için filtrat ve serumdaki total protein konsantrasyonu (µg/mL)					
		Filtrat	**Serum**		
		Medyan (min-mak)	**medyan (min-mak)**	***p_1***	***Cohen's d***
AS	30 dk	115,8 (61,6-268,3)	4875 (4615-5398,3)	***0,005***	***26,092***
	90 dk	74,1 (6-341)	5222,3 (4869,75-5593,5)	***0,005***	***29,689***
	p2	***0,093 (Hedges' g:0,313)***	***0,013 (Hedges' g:1,485)***		
SK	30 dk	110,8 (25-535)	4848,33 (4570-9505)	***0,008***	***4,216***
	90 dk	44,75 (1-457,25)	5047,25 (4952,25-8522,25)	***0,008***	***5,461***
	p3	***0,017 (Hedges' g: 0,597)***	***0,173 (Hedges' g: 0,057)***		
İnkübasyon süresindeki değişimin yarattığı fark	AS'de	-38,2 (-117,3; 174,3)	331 (-209,8; 565,2)	***0,004***	***0,989***
	SK'de	-75,0 (-186,5; 65,6)	206,4 (-982,7; 456)	***0,034***	***0,538***
	p4	***0,096 (Cohen's d:0,609)***	***0,288 (Cohen's d:0,543)***		

dk: dakika; min-mak: minimum-maksimum, AS: Ankilozan spondilit; SK: sağlıklı kontrol; p_1: serum ve filtrat karşılaştırması; p_2: AS grubunda inkübasyon sürelerinin karşılaştırılması; p_3: SK grubunda inkübasyon sürelerinin karşılaştırılması; p4: AS ve HC gruplarının karşılaştırılması; Cohen's d ve Hedges' g: etki büyüklüğü; [1,2,3]Wilcoxon Signed Ranks test, [4]Mann-Whitney U test

İzolasyon için kullanılan kolonun güvenirliğini değerlendirmek amacıyla hasta ve sağlıklı kontrollerin *serum/filtrat saflık bulguları* karşılaştırılmıştır. AS ve SK gruplarının 30 ve 90 dk'lık *saflık düzeyleri* arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (30 dk inkübasyon sonrası: p=0,720 ve cohen's d=0,630; 90 dk inkübasyon sonrası: p=0,447 ve cohen's d=0,654; Tablo 7).

Tablo 7. İzolasyon için kullanılan yöntemin güvenirlik açısından değerlendirilmesi

Serum/Filtrat saflık bulgusu (ug/mL)				
	AS	SK	*p*	*Cohen's d*
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)		
•Saflık Düzeyi 30. dk	4792,50±229,04 (4718,33)	5548,89±1679,82 (4785,0)	***0,720***	***0,630***
•Saflık Düzeyi 90. dk	5113,30±214,0 (5050,0)	5714,14±1281,28 (5050,0)	***0,447***	***0,654***

AS: Ankilozan spondilit; SK: Sağlıklı kontrol; dk: dakika; ort: ortalama; SS: standart sapma; p: anlamlılık değeri-Mann Whitney U test; Cohen's d: etki büyüklüğü; •Serum-filtrat farkı

BCA *(liziz-)* analiz sonuçlarını desteklemek amacıyla yapılan ELISA'da, hem AS hem SK gruplarında, serum albümin konsantrasyonu seviyesi filtrattaki albumin konsantrasyonundan önemli ölçüde yüksekti (AS için p_2=0,005 ve cohen's d:13,220; SK için p_2=0,005 ve cohen's d:10,828; Tablo 8). AS ve SK gruplarının hem serumdaki hem filtrattaki albümin seviyeleri arasında anlamlı bir fark yoktu (p_1>0,05).

Tablo 8. Albumin konsantrasyonunun belirlenmesi

Albumin konsantrasyon düzeyi (10^8) (pg/mL)				
	AS	SK	p_1	*Cohen's d*
	medyan (min-mak)	medyan (min-mak)		
Filtrat	0,52 (0,00001-14,0)	0,13 (0,0001-2,6)	***0,089***	***0,579***
Serum	199,17 (174,7-236,3)	183,75 (161,1-234,9)	***0,280***	***0,373***
p_2	***0,005 (Cohen's d:13,220)***	***0,005 (Cohen's d:10,828)***		

AS: Ankilozan spondilit, SK: sağlıklı kontrol, min-mak: minimum-maksimum; p_1: AS ve SK gruplarının karşılaştırılması-Mann Whitney U test; p_2: filtrat ve serum karşılaştırması-Wilcoxon Signed Ranks test; Cohen's d: etki büyüklüğü

6.2. BCA *(liziz+)* ile AS'de Eksozom Konsantrasyonundaki Değişim

AS sürecinde total eksozom konsantrasyonundaki değişimi gözlemlemek için yapılan liziz işleminin gerçekleştirildiği BCA analizinin sonuçları Tablo 9'da verilmiştir.

AS grubunun toplam protein konsantrasyonunun, 30 dakikalık inkübasyondan sonra SK grubununkinden önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (p_1=0,049 ve

cohen's d=0,905). Ancak 90 dakikalık inkübasyondan sonra her iki grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (p_1=0,190 ve cohen's d=0,502). Ayrıca, inkübasyon süresindeki değişimin AS ve SK gruplarının protein konsantrasyonlarında yarattığı fark arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p_1=0,406 ve cohen's d=0,370).

Tablo 9. BCA *(liziz+)* ile eksozomal total protein konsantrasyonunun değerlendirilmesi

	Her inkübasyon süresi için AS ve SK gruplarında total protein konsantrasyonu (µg/mL)			
	AS	**SK**		
	medyan (min-mak)	**medyan (min-mak)**	***P_1***	***Cohen's d***
30 dk	66,84 (5,31-374,5)	26,46 (9,15-116,08)	***0,049***	***0,905***
90 dk	70,67 (15,39-223,72)	44 (4,28-141,5)	***0,190***	***0,502***
P_2	***0,959 (Hedges' g:0,231)***	***0,139 (Hedges' g:0,517)***		
İnkübasyon süresindeki değişimin yarattığı fark	-0,08 (-0,42; 0,21)	-0,07 (-0,18; 0,08)	***0,406***	***0,370***

dk: dakika; min-mak: minimum-maksimum, AS: Ankilozan spondilit; SK: sağlıklı kontrol; p_1: AS ve SK gruplarının karşılaştırılması - Mann Whitney U test; p_2:inkübasyon sürelerinin karşılaştırılması; Cohen's d: etki büyüklüğü

6.3. Liziz İşleminin ve İnkübasyon Süresinin BCA Sonuçlarına Etkisi

BCA yöntemine etkisi incelenen faktörlerden birisi inkübasyon süresidir.

Liziz işlemi yokken, uzun inkübasyon süresi AS grubunda sadece serum protein konsantrasyonunu önemli ölçüde etkilerken (p_2=0,013 ve Hedges' g=1,485), SK grubunda sadece filtratın protein konsantrasyonu üzerinde anlamlı etki yaratmıştır (p_3=0,017 ve Hedges' g=0,597, tablo 6). İnkübasyon süresindeki değişimin yarattığı farkın miktarı da, AS ve SK gruplarında değerlendirimiş ve tablo 6'da verilmiştir. İnkübasyon süresindeki değişiklik her iki grupta da filtrata kıyasla serumda anlamlı bir fark yaratırken (AS için p_1=0,004 ve cohen's d=0,989; SK için p_1=0,034 ve cohen's d=0,538; Tablo 6), iki grubun fark değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (filtrat için p_4=0,096 ve cohen's d=0,609; serum için p_4=0,288 ve cohen's d=0,543; Tablo 6).

Liziz işlemi varken, hem AS hem SK grubunda filtratların 30 ve 90 dakikalık inkübasyon sonuçları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (AS için p=0,959 ve Hedges' g=0,231; SK için p=0,139 ve Hedges'g=0,517, Tablo 9). İnkübasyon

süresindeki değişimin AS grubunda yarattığı fark ile SK grubunda yarattığı fark arasında da anlamlı bir fark saptanmamıştır (p_2=0,406 ve cohen's d:0,370; Tablo 9).

Bu çalışmada BCA yöntemine etkisi irdelenen faktörlerden bir diğeri liziz işlemidir. AS grubunda 30 veya 90 dakikada liziz önemli bir fark göstermemiştir, fakat 30 dakikalık inkübasyonda aradaki fark dikkat çekicidir (sırasıyla, p=0,063 ve cohen's d=0,391*;* p=0,971 ve cohen's d=0,286, Tablo 10). SK grubunda ise sadece 30 dakikalık inkübasyondan sonra protein konsantrasyonu önemli ölçüde farklılık göstermiştir (p=0,011 ve cohen's d=1,109; Tablo 10).

Tablo 10. Lizis yönteminin BCA sonuçlarına etkisinin değerlendirilmesi

		BCA yöntemi ile ölçülen protein konsantrasyonu (µg/mL)			
		Lizis (-)	**Lizis (+)**	***p***	***Cohen's d***
		Medyan (min-mak)	**Medyan (min-mak)**		
AS	**30. dk**	115,8 (61,6-268,3)	66,84 (5,31-374,5)	***0,063***	***0,391***
	90. dk	74,1 (6-341)	70,67 (15,39-223,72)	***0,971***	***0,286***
SK	**30. dk**	110,8 (25-535)	26,46 (9,15-116,08)	***0,011***	***1,109***
	90. dk	44,75 (1-457,25)	44 (4,28-141,5)	***0,769***	***1,533***

AS: Ankilozan spondilit; SK: Sağlıklı kontrol; dk: dakika;min-mak: minimum-maksimum; p: anlamlılık değeri-Mann Whitney U test; Cohen's d: etki büyüklüğü

6.4. Eksozom Yüzeyindeki Belirteçlerin FC Analizi

AS hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubundan izole edilen eksozomlar 4 antikor kokteyli ile boyandığında FL_1, FL_2 ve FL_3 histogram grafiklerinden elde edilen sonuçların analizi Tablo 11 ve tablo 12'de verilmiştir. Tablo 11'de tüm AS hasta grubu ile sağlıklı kontrollerin, tablo 12'de ise hafif seyirli (mAS) ve şiddetli AS (sAS) hasta grupları ile sağlıklı kontrol (SK) grubunun yüzey belirteçlerinin ayrıntılı bir nicel analizi gösterilmektedir.

Tablo 11.Çalışma gruplarına göre eksozomal yüzey belirteçlerinin analizi

	AS	SK	P	Cohen's d
	Medyan (min-mak)	**Medyan (min-mak)**		
TSG101(%)	11,5 (0-24,5)	0,30 (0-34,1)	[2]**0,023**	**0,702**
CD86(%)	54,4 (37,6-57,2)	11,9 (4,2-23,4)	[2]**0,001**	**5,614**
IL-17A(%)	43,7 (0-49,2)	14,7 (4,1-29,2)	[2]**0,002**	**2,103**
IL-12(p35) (%)	40,39 (0-59,5)	0,92 (0-14,3)	[2]**0,002**	**2,160**
IFNg(%)	57,86 (39,6-68,8)	50,15 (39,52-60,56)	[2]**0,247**	**0,563**
	Ortalama±SS	**Ortalama±SS**		
CD3(%)	54,33±9,04	19,59±7,36	[1]**0,001**	**4,336**
TNFa(%)	37,92±12,46	14,88±9,53	[1]**0,001**	**2,077**

AS: Ankilozan Spondilit, SK: Sağlıklı kontrol, SS: standart sapma, min-mak: minimum-maksimum; P: AS ve SK grup karşılaştırması; [1]Student t test, [2]Mann-Whitney U test; Cohen's d: etki büyüklüğü

Tablo 12.AS şiddetine göre eksozomal yüzey belirteçlerinin analizi

	mAS	sAS	SK	P	n^2
	Medyan (min-mak)	**Medyan (min-mak)**	**Medyan (min-mak)**		
TSG101(%)	11,5 (0-14,4)	10,5 (4,3-24,5)	0,30 (0-34,1)	[1]**0,064**	**0,395**
CD86(%)	58,2 (54,2- 58,8)	52,7 (37,6-57,2)	11,9 (4,2-23,4)	[1]**0,001**	**3,236**
IL-17A(%)	41,1 (0-48,2)	43,7 (40,2-49,2)	14,7 (4,1-29,2)	[1]**0,007**	**0,922**
IL-12(p35) (%)	27,4 (0-59,5)	40,4 (17,1-46,5)	0,92 (0-14,3)	[1]**0,009**	**0,843**
IFNg(%)	44,96 (39,6-57,4)	58,97 (57,6-68,8)	50,15 (39,52-60,56)	[1]**0,014**	**0,820**
	Ortalama±SS	**Ortalama±SS**	**Ortalama±SS**		
CD3(%)	57,68±6,90	52,11±10,18	19,59±7,36	[2]**0,001**	**2,113**
TNFa(%)	31,59±18,76	42,13±3,90	14,88±9,53	[2]**0,001**	**0,978**

SS:standart sapma, min-mak:minimum-maksimum; SK:Sağlıklı control; mAS:hafif seyirli AS; sAS; Şiddetli AS; P: üç grubun karşılaştırılması; [1]Kruskall Wallis test, [2]Oneway ANOVA test; n^2: Eta squared

AS ve SK gruplarının TSG101 (%) düzeyleri arasında ortalama etki gücüne sahip anlamlı bir fark bulunmuştur: AS hasta grubunun TSG101 (%) düzeyi SK grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (p=0,023 ve cohen's d=0,702; Tablo 11). Fakat kötü seyirli ve iyi seyirli AS hasta gruplarının TSG101 oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p=0,064 ve n^2=0,95, Tablo 12).

CD3 ve CD86 (%) düzeyleri bakımından AS ve SK grupları arasında kuvvetli etki büyüklüğüne sahip anlamlı bir fark bulunmuştur: AS hasta grubunun CD3 ve CD86 düzeyleri (%) sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (p=0,001 ve cohen's d=4,336 ve CD86 için p=0,001 ve cohen's d=5,614, Tablo 11). İyi seyirli ve kötü seyirli AS hasta gruplarının CD3 ve CD86 oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken (p>0.05), bu iki grubun CD3 ve CD86 oranları kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir (CD3 için p=0,001 ve n^2=2,113, CD86 için p=0,001 ve n^2=3,236, Tablo 12).

IL-17A ve IL-12(p35) (%) düzeyleri bakımından AS ve SK grupları arasında kuvvetli etki gücünde anlamlı bir fark bulunmuştur: AS hasta grubunun IL-17A ve IL-12(p35) düzeyi (%) SK grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (IL-17A için p=0,002 ve cohen's d=2,103; IL-12p(35) için p=0,002 ve cohen's d=2,160, Tablo 11). Fakat iyi seyirli ve kötü seyirli AS hasta gruplarının IL-17A ve IL-12(p35) oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05). Öte yandan, kötü seyirli AS hasta grubunun IL-17A ve IL-12 (p35) düzeyi kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek (IL-17A için p=0,007 ve n^2=0,922, IL-12p(35) için p=0,009 ve n^2=0,843, Tablo 12) olup, iyi seyirli AS grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

AS hasta grubunun IFNg düzeyi ile sağlıklı kontrol grubunun IFNg düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p=0,247 ve cohen's d=0,563 Tablo 11). Fakat kötü seyirli grubun IFNg düzeyi iyi seyirli gruptan yüksek saptanmış olup, aynı zamanda sağlıklı kontrol grubundan da yüksektir (p=0,014 ve n^2=0,820, Tablo 12). İyi seyirli grup ile sağlıklı kontroller arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

TNFa (%) düzeyleri bakımından AS ve SK grupları arasında kuvvetli etki gücünde anlamlı bir fark bulunmuştur: AS hasta grubunun TNFa düzeyi sağlıklı kontrol grubundan anlamlı derecede yüksektir (p=0,001 ve cohen's d=2,077; Tablo 11). İyi seyirli AS grubu ile kötü seyirli AS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken (p>0.05), iyi seyirli ve kötü seyirli AS gruplarının TNFa düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (sırasıyla p<0.05, p<0.01, Tablo 12).

AS sürecinde aktif olan yapıların eksozom olduğunu doğrulamak ve bu eksozomların orijinini ve sitokin profilini göstermek için yüzey belirteçlerinin çift pozitifliği de değerlendirildi ve FL1-FL2, FL1-FL3 ve FL2-FL3 nokta grafiklerinden elde edilen sonuçların analizi Tablo 13 ve 14'te verildi.

CD86+TSG101+, IL17A+TSG101+, TNFa+TSG101+ ve IL12(p35)+TSG101+ çift pozitiflik düzeyleri bakımından AS ve SK grupları arasında kuvvetli etki büyüklüğüne sahip anlamlı bir fark vardır: AS grubunun düzeyleri SK grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (CD86+TSG101+ için p<0,05 ve cohen's d>0,8; diğerleri için p<0,01 ve cohen's d>0,8; Tablo 13). Aynı belirteçler bakımından iyi seyirli AS ile şiddetli AS ve yine iyi seyirli AS ile SK grubu benzer özellik gösterirken (p>0,05), şiddetli AS ve SK grupları arasında kuvvetli etki gücünde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır: Şiddetli AS grubunun düzeyleri SK grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (CD86+TSG101+ için p<0,05 ve n^2>0,26; diğerleri için p<0,01 ve n^2>0,26; Tablo 14).

Tablo 13. Çalışma gruplarına göre eksozomal yüzey belirteçlerinin çift pozitiflik analizi

	AS	SK	P	Cohen's d
	Medyan (min-mak)	**Medyan (min-mak)**		
IL-17A+ TSG101+	23,7 (1,5-44,9)	2,6 (0-30,7)	[2]**0,002**	**1,739**
IFNg+TSG101+	10,3 (0-31,8)	4,1 (0-33,8)	[2]**0,165**	**0,574**
	Ortalama±SS	**Ortalama±SS**		
CD3+TSG101+	20,99±14,18	7,91±13,98	[1]**0,048**	**0,929**
CD86+TSG101+	22,90±13,08	6,07±13,87	[1]**0,012**	**1,248**
TNFa+TSG101+	19,36±10,74	5,01±8,26	[1]**0,004**	**1,498**
IL-12(p35)+ TSG101+	18,68±10,33	3,51±6,04	[1]**0,001**	**1,793**
CD3+IL-17+	43,13±4,06	26,47±5,07	[1]**0,001**	**3,627**
CD3+IFNg+	44,67±2,27	32,88±6,47	[1]**0,001**	**2,432**
CD86+TNFa+	41,31±4,96	22,86±6,42	[1]**0,001**	**3,216**
CD86+IL-12(p35)+	29,94±9,34	11,69±8,78	[1]**0,001**	**2,013**

AS: Ankilozan Spondilit, SK: Sağlıklı kontrol, SS: standart sapma, min-mak: minimum-maksimum; P: AS ve SK gruplarının kıyaslaması; [1]Student t test, [2]Mann-Whitney U test; Cohen's d: etki büyüklüğü

Tablo 14. AS şiddetine göre eksozomal yüzey belirteçlerinin çift pozitiflik analizi

	mAS	sAS	SK		
	Med (min-mak)	**Med (min-mak)**	**Med (min-mak)**	**P**	n^2
IL-17A+ TSG101+	21,1 (1,5-35,1)	28,5 (17,3-44,9)	2,6 (0-30,7)	[1]**0,009**	**0,890**
IFNg+TSG101+	9,8 (0-25,1)	10,3 (0,8-31,8)	4,1 (0-33,8)	[1]**0,316**	**0,301**
	Ortalama±SS	**Ortalama±SS**	**Ortalama±SS**		
CD3+TSG101+	17,47±10,82	23,35±16,59	7,91±13,98	[2]**0,132**	**0,490**
CD86+TSG101+	16,33±10,76	27,28±13,46	6,07±13,87	[2]**0,022**	**0,723**
TNFa+TSG101+	15,04±13,06	22,25±8,97	5,01±8,26	[2]**0,008**	**0,737**
IL-12(p35)+ TSG101+	12,22±13,36	22,99±5,42	3,51±6,04	[2]**0,001**	**0,937**
CD3+IL-17+	40,49±2,97	44,88±3,89	26,47±5,07	[2]**0,001**	**2,081**
CD3+IFNg+	43,19±1,58	45,67±2,19	32,88±6,47	[2]**0,001**	**1,473**
CD86+TNFa+	39,6±5,72	42,44±4,56	22,86±6,42	[2]**0,001**	**1,650**
CD86+IL-12(p35)+	28,92±13,88	30,62±6,33	11,69±8,78	[2]**0,002**	**0,899**

SS: standart sapma, min-mak: minimum-maksimum; SK: Sağlıklı control; mAS: hafif seyirli AS; sAS; Şiddetli AS; P: mAS, sAS ve SK gruplarının karşılaştırılması; [1]Kruskall Wallis test, [2]Oneway ANOVA test; n^2: Eta squared

CD3+TSG101+ çift pozitiflik düzeyi (%) bakımından AS ve SK grupları arasında kuvvetli etki gücünde anlamlı bir fark vardır: AS grubunun düzeyi SK grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir (p=0,048 ve cohen's d=0,929; Tablo 13). İyi seyirli AS, şiddetli AS ve SK grupları aynı belirteç bakımından benzer özellik göstermektedir (p=0,132 ve n^2=0,490; Tablo 14).

IFNg+TSG101+ çift pozitiflik düzeyi (%) bakımından AS ve SK grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır (p=0,165 ve cohen's d=0,574, Tablo 13). İyi seyirli AS, şiddetli AS ve SK grupları aynı belirteç bakımından benzer özellik göstermektedir (p=0,316 ve n^2=0,301; Tablo 14).

CD3+IL17A+, CD3+IFNg+, CD86+TNFa+ ve CD86+IL12(p35)+ çift pozitiflik düzeyleri (%) bakımından AS ve SK grupları arasında kuvvetli etki büyüklüğüne sahip anlamlı bir fark vardır: AS grubunun düzeyleri SK grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir (hepsi için p<0,01 ve cohen's d>0,8, Tablo 13). Aynı belirteçler AS'nin alt grupları (iyi seyirli AS ve şiddetli AS) ve SK arasında değerlendirildiğinde, fark yaratan grup kontrol grubu olmuştur: İyi seyirli AS ile şiddetli AS grupları birbirine benzerken (p>0,05), iyi seyirli AS ve şiddetli AS gruplarının düzeyleri SK grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır (tüm belirteçler için p<0,01 ve n^2>0,26; Tablo 14).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

AS'nin kesin patogenezi bilinmese de, literatürdeki pek çok çalışma, genetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonu sonucu oluşan inflamatuvar otoimmün bir hastalık olduğunu ortaya koymuştur. AS immün aracılı bir hastalık olduğu için, immün hücrelerin hem birbirleriyle hem de inflamatuar bölge ile iletişiminin hastalığın oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rolü olması gerekir. Bu hücrelerarası iletişim hastalığın patogenezini ve sonucunu belirleyebilir. Hücrelerarası iletişim kimyasal moleküller aracılığıyla olabileceği gibi ekstrasellüler vezikül (EV) denilen kesecikler –özellikle de bir EV tipi olan eksozomlar- aracılığıyla da gerçekleşebilir.

Eksozomlar, taşıdıkları biyoaktif moleküllerle hedef hücrelerin davranışını değiştirebildikleri –fizyolojisini modifiye edebildikleri- için inflamatuvar olayları kontrol etme potansiyeline sahiptir (Console ve ark, 2019; Shao ve ark, 2018; Matsuzaka ve Yashiro, 2022). Çalışmalar, sistemik immün ve inflamatuvar belirtileri olan kronik bir otoimmün eklem hastalığı olan Romatoit artrit (RA)'da eksozom aktivitesinin arttığını göstermiştir (Ding ve ark, 2020; Fan ve ark, 2022; Schioppo ve ark, 2021; Miao ve ark, 2022). Bu çalışmaların sonuçlarını ve RA ile AS arasındaki benzerlik ve farklılıkları göz önünde bulundurarak, bu çalışmada, inflamatuvar otoimmün bir hastalık olan AS'de eksozomların oranlarındaki, orijinindeki ve sitokin profilindeki değişimin araştırılması amaçlanmıştır.

Mevcut literatürde eksozomların izolasyonu ve ardından biyokimyasal ve fiziksel analizi için farklı yöntemler vardır. Fakat eksozomlarla benzer fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip farklı yapılar mevcut olduğu için bu yöntemlerin hiçbiri, eksozomların hem izolasyonu hem de karakterizasyonu için tek başına yeterli olmayıp birbirini tamamlayacak ve destekleyecek farklı yöntemler kullanılmalıdır (Hartjes ve ark, 2019; Li ve ark, 2019; Shao ve ark, 2018; Auger ve ark, 2022; Patel ve ark, 2019). Bu gerekçe ile, bu çalışmada da, araştırma sorusuna ve *downstream* uygulamalara göre sonuçları doğrulamak ve daha ileriki çalışmalar için doğrulanmış bir algoritma tasarlamak amacıyla santrifüj, SEC, FC, BCA ve ELISA yöntemleri kullanılmıştır.

Öncelikle, hem morfolojik hem fizyolojik olarak sağlam eksozomları insan vücut sıvılarından daha düşük seviyedeki kirleticilerle izole edebildiği ve aşırı numune gerektirmediği için diğer izolasyon yöntemlerinden daha iyi olduğu en son bulgularla da desteklenen (Hong ve ark. 2017;Navajas ve ark, 2019; Sidhom ve ark, 2020) SEC yöntemi ile eksozomca zengin filtrat elde edildi. Filtratın saflığı *downstream* analizlerin sonucunu çok büyük ölçüde etkileyeceği için filtratın saflık derecesi BCA *(liziz-)* analizi ile belirlendi. BCA*(liziz-)* sonuçlarını desteklemek için ELISA analizi yapıldı. BCA*(liziz-)* ve ELISA analizlerine göre SEC'e dayanan $qEV_{2/35\ nm}$ kolonları ile elde edilen filtratların seruma kıyasla yüksek derecede saf olduğu bulundu. Bu çalışmada kullanılan saflık terimi ile, tek bir hücre tipinden türetilen tek bir EV tipi değil, serum EV'lerinde bulunması beklenmeyen fakat EV'lerle birlikte izole olabilen apolipoprotein, albümin, uromodulin gibi EV olmayan partiküllerin (serum proteinlerinin) yokluğu veya düşük kontaminasyonu kastedilmektedir.

Sonra eksozomların biyokimyasal özelliklerinden yararlanarak afinite bazlı izolasyon yöntemi ile eksozom izolasyonu tamamlanmıştır. Bu aşamada, filtrat içindeki eksozomlar hemen hemen her hücre tipinden türevlenen eksozomların yüzeyinde bulunan tetraspanin CD9, CD63 ve CD81 antikorları ile kaplanan Straptavidin manyetik boncuklar ile yakalandı. Eksozomun varlığını doğrulamak için ve AS sürecinde ve sağlıklı durumda eksozom profilini *(eksozom oranlarını, kökenlerini ve sitokin profillerini)* ortaya koyup karşılaştırmak için FC yöntemi ile eksozomal yüzey proteinlerinin analizi gerçekleştirildi. Çünkü, klinik numunelerdeki yapıların farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin tekrarlanabilir analizine izin veren FC'nin aksine (Sidhom ve ark, 2020), NTA ve DLS fenotip bilgisine fazla bir şey eklemeden eksozomun boyut aralığı ve konsantrasyonunun tanımıyla sınırlıdır (Franquesa ve ark, 2014). Western blot yöntemi ise, eksozom üzerinde bulunabilecek birden fazla proteini aynı anda tespit edemediği için, yani aynı eksozom üzerinde farklı proteinlerin bulunup bulunmadığı hakkında yeterli bilgi veremediği için bu çalışmanın araştırma sorusuna hizmet etmemektedir.

FC eksozomların ancak semikantitatif analizini (yarı nicel karakterizasyonunu) sağlayabildiğinden, eksozom konsantrasyonundaki değişim ile ilgili FC bulgusunu desteklemek için, aynı zamanda hasta ve sağlıklı grupların total eksozomal protein

konsantrasyonları BCA *(liziz+)* analizi ile ölçülmüş ve FC sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Öte yandan, çalışmanın 2. amacı olan yöntem hakkında bilgi edinmek için BCA *(liziz+)* ve BCA*(liziz-)* yöntemlerinde 30 ve 90 dakikalık iki ayrı inkübasyon süresi uygulanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Böylece inkübasyon süresi ve liziz işleminin BCA sonuçlarına etkisi değerlendirilmiştir.

AS grubunda, serumun 90 dakikalık inkübasyonu 30 dakikalık inkübasyonuna göre daha yüksek bir protein konsantrasyonuna neden olurken, filtratın iki inkübasyon süresi arasında anlamlı bir fark yoktu. Bu durum, filtrat elde edilirken SEC yöntemi ile serum içindeki proteinlerin önemli bir kısmı süzüldüğü için beklenilen bir sonuçtur. SK grubunda ise, filtratın 30 dakikalık inkübasyonu 90 dakikalık inkübasyonuna göre daha yüksek bir protein konsantrasyonu ortaya koyarken, serumun iki inkübasyon süresi arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Yani hem filtratta hem serumda 90 dakikalık daha uzun bir inkübasyon süresi, muhtemelen proteinlerin denatürasyonları nedeniyle, protein konsantrasyonunu önemli ölçüde etkilemedi. BCA yöntemi, oldukça alkali bir ortamda gerçekleşmektedir. İnkübasyon süresindeki artış, eksozomal proteinlerin yüksek alkali ortam ile daha uzun süre temasına ve dolayısıyla yapısının bozulmasına neden olmuş olabilir.

Öte yandan literatürdeki bazı çalışmalar daha doğru sonuçlara ulaşabilmek için liziz işlemini önerse de, bu çalışmada liziz işleminin uygulandığı ve uygulanmadığı numunelerin protein konsantrasyonları arasında anlamlı hiçbir farklılık gözlemlenemedi. Bu bulgular Franquessa ve ark. 2014'ün sonuçlarıyla uyumludur. Bu sonuç, liziz işlemi için kullanılan sonikasyonun ve RIPA tamponunun olumsuz etkisi ile ilgili olabilir: Sonikasyon sırasında üretilen ısı proteinlere zarar vermiş olabilir.

ISEV'e (Uluslararası Hücre Dışı Veziküller Derneği) göre eksozomun varlığını doğrulamak için, eksozomlarda bulunması beklenen CD9, CD63 ve CD81 gibi transmembran proteinlerin ve eksozom sentezinde görev alan ALIX, TSG101 gibi proteinlerin varlığı birlikte gösterilmelidir. FL1 kanalında TSG101 antikoruna bağlı FITC ışıması, üzerinde çalıştığımız yapıların hem CD9, CD63, CD81

tetraspaninlerinden en az birini ve hem de TSG101'i içerdiğinin ve dolayısıyla eksozom olduğunun kanıtıdır. Ek 1'de, FL1-FL3 ve FL1-FL2 nokta grafiklerinde kadranın sağ üst bölgesinde gözlenen floresan yoğunlukları ve ortalamaları, bu çalışmada incelenen CD3, CD86, IL-17, IFNg, TNFa ve IL-12 (p35) antijenlerini taşıyan yapıların eksozom olduğunu göstermektedir. Özetle, eksozomda bulunması beklenen CD9, CD63 ve CD81 gibi transmembran proteinler ve eksozom sentezinde görev alan TSG101 ile birlikte CD3, CD86, IL17, IFNg, TNFa, IL12 (p35) antijenlerinin varlığını göstererek, bu çalışmada incelenen yapıların eksozom olduğu doğrulandı (Ek 1).

BCA *(liziz+)* analizi ile uyumlu olarak, FC analizi, TSG101+ eksozomların kontrollerle karşılaştırıldığında AS grubunda (hastalık şiddetine göre anlamlı bir fark göstermeksizin) arttığını gösterdi (Ek 2). Hücresel kökenleri belirlemek için yapılan çift pozitiflik analizi, AS'nin hem adaptif hem doğuştan gelen bağışıklığı içeren immünolojik doğası ile tutarlı olarak, eksozomların T lenfositlerinden ve makrofajlardan türevlendiğini, T lenfosit türevli eksozomların AS durumunda kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha fazla seviyede IFN-g ve IL-17A taşıdığını, makrofaj türevli eksozomların ise daha fazla TNF-a ve IL-12(p35) taşıdığını ortaya koydu (Ek 3, 4 ve 5). Ancak PBMC hücrelerinin sitokin üretiminde değişikliklere neden olan genetik çeşitlilik ve uykusuzluk, diyet/içerik, ağır metal alımı, hava kirliliği, sosyal stresörler gibi çevresel değişkenlerin neden olduğu bireysel farklılıklar (Audet ve ark, 2014; Bauer ve ark.2021; Schirmer ve ark, 2018), ölçümlerde önemli bir standart sapmaya yol açmıştır.

Özetle, AS sürecinde T hücre türevli eksozomların oranı ve bu eksozomların memranındaki IL-17A ve IFNg sitokin ekpresyon seviyeleri ile makrofaj türevli eksozomların ve bu eksozomların membranındaki TNFa ve IL-12(p35) sitokin ekspresyon seviyeleri artmıştır. Fakat eksozom profili AS seyrine göre değişmemiştir. Bu ilk ön sonuçlar, AS'de eksozomal katkının arttığını desteklemektedir. Bu nedenle, AS ve eksozom ilişkisini ortaya koymaya çalışan daha ileri çalışmalar ile AS'nin patogenezi aydınlatılabilir. Bu çalışmaların ışığında, eksozomların salınımının regülasyonu, AS'de yeni terapötik bir hedef olabilir.

Bu çalışmanın en büyük kısıtlılıkları, nispeten küçük örneklem büyüklüğü ve metodolojik belirsizlikti. Bu nedenle, daha doğru sonuçlar elde etmek için eksozomal aktivitenin hem BCA hem de flow sitometrik analizi gerçekleştirildi ve tutarlı sonuçlar elde edildi. Ek olarak, her iki grupta da eksozomun kesitsel analizi ile ilgili olarak, eksozom kantifikasyonundaki olası dinamik varyasyonlar ortaya çıkarılamadı. Bu nedenle, bu çalışmada uygulanan yöntem, daha ileri çalışmalarda, partikül sayısını ölçen NTA, RPS, cryo-EM ya da benzer yeteneklere sahip diğer teknikler ile kuvvetlendirilebilir. Ayrıca, AS hastalarının yeni tanı hastası olmamaları, tedavi almış olmaları da önemli bir diğer kısıtlılıktı.

Öte yandan bu çalışmada katılımcıların periferik kan örneklerinden elde edilen serumdaki eksozomlar incelendi. Plazma tercih edilmedi, çünkü içindeki pıhtılaşma faktörü eksozomlarla birlikte izole edilebilmekte ve tekrar süspansiyon haline getirilmesi zor bir pellet oluşturabilmekte, bu da düşük verimi nedeniyle numunenin tekrar kullanılmasını önlemektedir. Ancak serum, pıhtı oluşumu sırasında üretilen trombosit türevli birçok hücre dışı vezikül içerebileceğinden, vücuttaki koşulları daha iyi yansıttığı düşünülen plazma kullanılarak da benzer çalışmalar yapılabilir. Öte yandan, bu yöntemi sinovyal sıvı ile uygulamak, lokal inflamatuar yanıt hakkında ek ipuçları elde etmek için başka bir seçenek olabilir.

Özetle, AS'nin patogenezini aydınlatmak ve yeni tanı ve tedavi seçenekleri geliştirmek için daha büyük örneklemin ve farklı etnik gruplarının sinoviyal sıvı eksozomlarının analizini içeren ve çeşitli tekniklerle kuvvetlendirilmiş daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cellular and molecular neurobiology*, *36*, 301-312.

Aggarwal, S., & Gurney, A. L. (2002). IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *Journal of leukocyte biology*, *71*(1), 1-8.

Akgul, O., & Ozgocmen, S. (2011). Classification criteria for spondyloarthropathies. *World Journal of Orthopedics*, *2*(12), 107.

Akkoc, N. (2010). Turkiye'de romatizmal hastaliklarin epidemiyolojisi ve diger ulkelerle karsilastirilmasi. *RAED Dergisi*, *2*, 1-8.

Akar, S., & Önen, F. (2007). Ankilozan Spondilit Epidemiyolojisi. *Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, *3*(25), 1-12.

Altan, L. (2005). Ankilozan Spondilitte Güncel Tedavi Seçenekleri. *Türk Fizik Tedavi Rehabilitasyon Dergisi*, *51*, A3-A39.

Amatya, N., Garg, A. V., & Gaffen, S. L. (2017). IL-17 signaling: the yin and the yang. *Trends in immunology*, *38*(5), 310-322.

Angkasekwinai, P., & Dong, C. (2011). TH 17 Cytokines: Characteristics, Regulation, and Biological Function. *TH17 cells in health and disease*, 27-40.

Antimisiaris, S. G., Mourtas, S., & Marazioti, A. (2018). Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery. *Pharmaceutics*, *10*(4), 218.

Antoniou, A. N., Lenart, I., & Guiliano, D. B. (2011). Pathogenicity of misfolded and dimeric HLA-B27 molecules. *International journal of rheumatology*, *2011*.

Arda, N., & Ertan, H. (2018). Proteinlerin Nicel Analizi. Güler Temizkan ve Nazlı Arda (Ed.), *Temel ve Ileri Moleküler Biyoloji Yöntemleri: Genomik ve Proteomik Analizler* içinde (s. 503-512). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.

Auger, C., Brunel, A., Darbas, T., Akil, H., Perraud, A., Bégaud, G., ... & Verdier, M. (2022). Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis: A different appreciation of up and down secretion. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 2310.

Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S., & Kudo, A. (2000). Tumor necrosis factor-α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(7), 4858-4864.

Berke, E., Aydoğan, Ü., Doğaner, Y. Ç., & Yilmaz, S. (2019). Investigation of Delay in The Diagnosis of Ankylosing Spondylitis and Associated Factors on The

Diagnosis Process. *Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care*, *13*(4), 487-499.

Berumen Sánchez, G., Bunn, K. E., Pua, H. H., & Rafat, M. (2021). Extracellular vesicles: Mediators of intercellular communication in tissue injury and disease. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 1-18.

Bielecka, M., Obuchowicz, R., & Korkosz, M. (2018). The shape language in application to the diagnosis of cervical vertebrae pathology. *PloS one*, *13*(10), e0204546.

Birlik, A.M., & Akkoç, N. (2007). Ankilozan spondilitin medikal tedavisi. *Turkiye Klinikleri J. Int. Med. Sci.*, *3*(25),56-64.

Bowness, P., Ridley, A., Shaw, J., Chan, A. T., Wong-Baeza, I., Fleming, M., ... & Kollnberger, S. (2011). Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *The Journal of Immunology*, *186*(4), 2672-2680.

Bozkurt, S. (2018). Eksozomlar ve kanserdeki rolleri. *Dicle Tıp Dergisi*, *45*(2), 209-217.

Brown, M. A. (2011). Progress in the genetics of ankylosing spondylitis. *Briefings in functional genomics*, *10*(5), 249-257.

Brown, M. (2018). Solving the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Clinical Immunology*, *186*, 46-50.

Burton, P.R., Clayton, D.G., Cardon, L.R., Craddock, N., et al. (2007). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*, *39*:1329–1337.

Chen, B., Li, J., He, C., Li, D., Tong, W., Zou, Y., & Xu, W. (2017). Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Molecular medicine reports*, *15*(4), 1943-1951.

Chen, H. H., Chen, T. J., Chen, Y. M., Ying-Ming, C., & Chen, D. Y. (2011). Gender differences in ankylosing spondylitis-associated cumulative healthcare utilization: a population-based cohort study. *Clinics*, *66*, 251-254.

Chen, J., Li, P., Zhang, T., Xu, Z., Huang, X., Wang, R., & Du, L. (2022). Review on strategies and technologies for exosome isolation and purification. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 811971.

Chyuan, I. T., & Chen, J. Y. (2018). Role of interleukin-(IL-) 17 in the pathogenesis and targeted therapies in spondyloarthropathies. *Mediators of inflammation*, *2018*.

Cihankaya, H., Theiss, C., & Matschke, V. (2022). Significance of intercellular communication for neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, *17*(5), 1015.

Colombo, M., Moita, C., Van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., ... & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*, *126*(24), 5553-5565.

Console, L., Scalise, M., & Indiveri, C. (2019). Exosomes in inflammation and role as biomarkers. *Clinica Chimica Acta*, *488*, 165-171.

Cortes, A., Hadler, J., Pointon, J.P., Robinson, P.C., Karaderi, T., et al. (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet., 45*(7): 730–8.

Costantino, F., Breban, M., & Garchon, H. J. (2018). Genetics and functional genomics of spondyloarthritis. *Frontiers in immunology*, *9*, 2933.

Coumans, F. A., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E., El-Andaloussi, S., ... & Nieuwland, R. (2017). Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circulation research*, *120*(10), 1632-1648.

Cvjetkovic, A. (2019). *Isolation strategies and proteomic characterization of extracellular vesicles* [Unpublished doctoral dissertation]. University of Gothenburg.

Çakır, N., Pamuk, Ö. N., Derviş, E., İmeryüz, N., Uslu, H., Benian, Ö., ... & Şenocak, M. (2012). The prevalences of some rheumatic diseases in western Turkey: Havsa study. *Rheumatology international*, *32*, 895-908.

Çankaya, T. Ş. (2014). *Ankilozan spondilitli hastalarda interlökin-23 reseptör geni polimorfizminin araştırılması* [Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Afyon Kocatepe Üniversitesi.

Çayakar, A. (2018). Nedir Bu Tümör Nekrozis Faktör Alfa. *Turkiye Klinikleri J Intern Med*, *3*(2), 67-76.

Dai, S., Wei, D., Wu, Z., Zhou, X., Wei, X., Huang, H., & Li, G. (2008). Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Molecular therapy*, *16*(4), 782-790.

Dakwar, E., Reddy, J., Vale, F. L., & Uribe, J. S. (2008). A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Neurosurgical Focus*, *24*(1), E2.

Dangoria, N. S., DeLay, M. L., Kingsbury, D. J., Mear, J. P., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., & Colbert, R. A. (2002). HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(26), 23459-23468.

Daryabor, G., Harsini, S., & Rezaei, N. (2018). Immunopathogenesis of Ankylosing Spondylitis: An Updated Review. *Acta Medica Iranica*, 214-225.

Das, S., & Khader, S. (2017). Yin and yang of interleukin-17 in host immunity to infection. *F1000Research*, *6*, 741.

Davidson, A., & Diamond, B. (2020). General features of autoimmune disease. In N. R. Rose & I. R. Mackay (Eds), *The autoimmune diseases* (pp. 17-44). Academic Press.

Dean, L. E., Jones, G. T., MacDonald, A. G., Downham, C., Sturrock, R. D., & Macfarlane, G. J. (2014). Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, *53*(4), 650-657.

DeLay, M. L., Turner, M. J., Klenk, E. I., Smith, J. A., Sowders, D. P., & Colbert, R. A. (2009). HLA–B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis & Rheumatism*, *60*(9), 2633-2643.

Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W., & Geuze, H. J. (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of cell science*, *113*(19), 3365-3374.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-l in disease. *The Journal of The American Society of Hematology*, *87*(6).

Ding, Y., Wang, L., Wu, H., Zhao, Q., & Wu, S. (2020). Exosomes derived from synovial fibroblasts under hypoxia aggravate rheumatoid arthritis by regulating Treg/Th17 balance. *Experimental Biology and Medicine*, *245*(14), 1177-1186.

Duan, L., Rao, X., & Sigdel, K. R. (2019). Regulation of inflammation in autoimmune disease. *Journal of immunology research*, *2019*.

Duftner, C., Goldberger, C., Falkenbach, A., Würzner, R., Falkensammer, B., Pfeiffer, K. P., ... & Schirmer, M. (2003). Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4+ CD28-T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*, *5*(5), 1-9.

Ebrahimiadib, N., Berijani, S., Ghahari, M., & Pahlaviani, F. G. (2021). Ankylosing spondylitis. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, *16*(3), 462.

Edgar, J. R. (2016). Q&A: What are exosomes, exactly?. *BMC biology*, *14*(1), 1-7.

Elbey, B. (2015). Ankilozan spondilitli hastalarda güncel tedavi yaklaşımları. *Dicle Tıp Dergisi*, *42*(1), 123-127.

Ellinghaus, D., Jostins, L., Spain, S. L., Cortes, A., Bethune, J., Han, B., ... & Franke, A. (2016). Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new

associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nature genetics*, *48*(5), 510-518.

Elolemy, G., Aboughanima, A., Ganeb, S., & Elziat, H. (2020). Health-related quality of life in patients with ankylosing spondylitis: relationship with disease-related variables. *Current rheumatology reviews*, *16*(4), 311-318.

Ersözlü Bozkırlı, E.D. (2011). *Ankilozan spondilitli hastalarda infliksimab tedavisinin metabolik sendrom parametreleri, kardiyovasküler risk parametreleri ve framıngham kardiyovasküler risk skoru üzerine etkileri* [Yayımlanmamış Yan Dal Uzmanlık Tezi]. Başkent Üniversitesi.

Etiz, P. (2009). *Bölgemizdeki HLA (Human Lökosit Antijenleri) dağılımı* [Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi]. Çukurova Üniversitesi.

Elyan, M., & Khan, M. A. (2008). Update on the spondyloarthropathies. *Journal Of Musculoskeletal Medicine*, *25*(1), 31.

Etti, A. E., Assy, N., & Idan, C. (2018) Interleukin-1. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0028193

Evans, D.M., Spencer, C.C., Pointon, J.J., Su, Z., Harvey, D., Kochan, G., Oppermann, U., Dilthey, A., Pirinen, M., Stone, M.A., Appleton, L., Moutsianas, L., ….. &Donnelly P. (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet., 43*(8):761-7.

Evans, D. M., Spencer, C. C., Pointon, J. J., Su, Z., ... & Donnelly, P. (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature genetics*, *43*(8), 761-767.

Fan, Y., Li, Z., & He, Y. (2022). Exosomes in the pathogenesis, progression, and treatment of osteoarthritis. *Bioengineering*, *9*(3), 99.

Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Ripoll, E., Luk, F., Salih, M., Betjes, M. G., ... & Merino, A. M. (2014). Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells. *Frontiers in immunology*, *5*, 525.

Gaffen, S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*, *9*(8), 556-567.

Garcia-Montoya, L., Gul, H., & Emery, P. (2018). Recent advances in ankylosing spondylitis: understanding the disease and management. *F1000Research*, *7*.

Gee, K., Guzzo, C., Che Mat, N. F., Ma, W., & Kumar, A. (2009). The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)*, *8*(1), 40-52.

Ghasemi-Rad, M., Attaya, H., Lesha, E., Vegh, A., Maleki-Miandoab, T., Nosair, E., ... & Mohammadi, A. (2015). Ankylosing spondylitis: A state of the art factual backbone. *World journal of radiology*, *7*(9), 236.

Gu, C., Wu, L., & Li, X. (2013). IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*, *64*(2), 477-485.

Gulati, K., Guhathakurta, S., Joshi, J., Rai, N., & Ray, A. J. M. I. (2016). Cytokines and their role in health and disease: a brief overview. *Moj Immunol*, *4*(2), 00121.

Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 1-19.

Gündüz, O. H., Erdal, A. (2014). Ankilozan spondilitte tanı ve klinik takip. *Turkiye Klinikleri J PM&R -Special Topics*, *7*(3),16-27.

Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. H. (2019). Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, *8*(4), 307.

Green, D. S., Young, H. A., & Valencia, J. C. (2017). Current prospects of type II interferon γ signaling and autoimmunity. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(34), 13925-13933.

Gresnigt, M. S., & van de Veerdonk, F. L. (2016). Modulating Inflammatory Cytokines: IL-1. In D. Boraschi & G. Penton-Rol (Eds.) ,*Immune Rebalancing* (pp. 151-171). Academic Press.

Haroon, N. (2012). *The Role of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 (ERAP1) in the Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis*. University of Toronto (Canada).

Haroon, M. M., Sayed, S., & Gheita, T. A. (2018). Gender differences in ankylosing spondylitis patients: relation to clinical characteristics, functional status and disease activity. *Int J Clin Rheumatol*, *13*(4), 258-262.

Hartjes, T. A., Mytnyk, S., Jenster, G. W., van Steijn, V., & van Royen, M. E. (2019). Extracellular vesicle quantification and characterization: common methods and emerging approaches. *Bioengineering*, *6*(1), 7.

Haynes, K. R., Pettit, A. R., Duan, R., Tseng, H. W., Glant, T. T., Brown, M. A., & Thomas, G. P. (2012). Excessive bone formation in a mouse model of ankylosing spondylitis is associated with decreases in Wnt pathway inhibitors. *Arthritis research & therapy*, *14*(6), 1-12.

Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*, 193-208.

Hinze, A. M., & Louie, G. H. (2016). Osteoporosis management in ankylosing spondylitis. *Current treatment options in rheumatology*, *2*(4), 271-282.

Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H., & McDermott, M. F. (2019). Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research*, *8*(111), 111.

Hong, C. S., Funk, S., & Whiteside, T. L. (2017). Isolation of biologically active exosomes from plasma of patients with cancer. *Acute Myeloid Leukemia: Methods and Protocols*, 257-265.

Inshaw, J. R., Cutler, A. J., Burren, O. S., Stefana, M. I., & Todd, J. A. (2018). Approaches and advances in the genetic causes of autoimmune disease and their implications. *Nature immunology*, *19*(7), 674-684.

Iwakura, Y., & Ishigame, H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of clinical investigation*, *116*(5), 1218-1222.

Jafarpour, M., Omidvar, M. H., Soltani-Zangbar, M. S., Dolati, S., Ahmadi, M., Jadidi-Niaragh, F., ... & Yousefi, M. (2022). The effects of PBMCs-derived exosomes of ankylosing spondylitis patients on T cell profiles. *Gene Reports*, *26*, 101446.

Jan, A. T., Rahman, S., Khan, S., Tasduq, S. A., & Choi, I. (2019). Biology, pathophysiological role, and clinical implications of exosomes: a critical appraisal. *Cells*, *8*(2), 99.

Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., ... & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in autoimmune disease and current TNF-α inhibitors in therapeutics. *International journal of molecular sciences*, *22*(5), 2719.

Jethwa, H., & Bowness, P. (2016). The interleukin (IL)-23/IL-17 axis in ankylosing spondylitis: new advances and potentials for treatment. *Clinical & Experimental Immunology*, *183*(1), 30-36.

Jovanovic, D. V., Battista, J. A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F. C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., Pelletier, J-P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-b and TNF-a, by human macrophages. *The Journal of Immunology, 160*: 3513–3521.

Junn, E., & Mouradian, M. M. (2012). MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacology & therapeutics*, *133*(2), 142-150.

Kabasakal, Y. (2007). Ankilozan spondilitte klinik bulgular ve tanı. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci*, *3*(25):20-29.

Kahraman, T., Güçlüler, G., & Gürsel, İ. (2014). Eksozomlar: Tanı ve tedavide kullanılabilen doğal nanokesecik adayları. *Turkish Journal of Immunology*, *2*(2), 34-40.

Kanev, M., & Muranlı, F. G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya University Journal of Science*, *20*(1), 33-38.

Karadeniz, A. (2014). *Antı-tnf tedavi alan romatoıd artrıt ve ankılozan spondılıt hastalarında antı-tnf öncesi ve sonrası kardıyovaskuler risklerin belirlenmesi* [Yayımlanmamış Uzmanlık Tezi]. Marmara Üniversitesi.

Karataş, A. (2015). *Ankilozan spondilitli hastalarda hastalık aktivitesinin uyku bozukluklarına etkisi* [Yayımlanmamış Uzmanlık Tezi]. Ankara Üniversitesi.

Karkucak, M., Cakirbay, H., Capkin, E., Topbaş, M., Guler, M., Tosun, M., & Baltaci, D. (2011). The prevalence of ankylosing spondylitis in the eastern Black Sea region of Turkey. *European Journal of General Medicine*, *8*(1).

Kehl, A. S., Corr, M., & Weisman, M. H. (2016). Enthesitis: new insights into pathogenesis, diagnostic modalities, and treatment. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*, *68*(2), 312.

Kenna, T. J., & Brown, M. A. (2013). Immunopathogenesis of ankylosing spondylitis. *International Journal of Clinical Rheumatology*, *8*(2), 265.

Kenna, T. J., Robinson, P. C., & Haroon, N. (2015). Endoplasmic reticulum aminopeptidases in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, *54*(9), 1549-1556.

Khanna, I., & Tassiulas, I. (2022). Ankylosing spondylitis. *Rheumatology for Primary Care Providers: A Clinical Casebook*, 371-403.

Khmelinskii, N., Regel, A., & Baraliakos, X. (2018). The role of imaging in diagnosing axial spondyloarthritis. *Frontiers in medicine*, *5*, 106.

Kıbrıslı, E., Aslanhan, H., & Arslan, N. (2015). Birinci Basamakta Ankilozan Spondilit Hastalarına Yaklaşım. *Eurasian Journal of Family Medicine*, *4*(2), 39-46.

Kılıç, G., Özgöçmen, S. (2014). Ankilozan spondilitte medikal tedavi. *Turkiye Klinikleri J PM&R-Special Topics*, *7*(3), 35-43.

Kınıklı, G. (2014). Spondiloartropatiler. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Romatoloji ABD*, 252-264.

Kim, Y. S., Ahn, J. S., Kim, S., Kim, H. J., Kim, S. H., & Kang, J. S. (2018). The potential theragnostic (diagnostic+ therapeutic) application of exosomes in diverse biomedical fields. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, *22*(2), 113-125.

Kim, J. W., Park, S., Jung, J. Y., Kim, H. A., Kwon, S. R., Choi, S. T., ... & Suh, C. H. (2022). Prevalence and Factors of Osteoporosis and High Risk of Osteoporotic Fracture in Patients with Ankylosing Spondylitis: A Multicenter Comparative Study of Bone Mineral Density and the Fracture Risk Assessment Tool. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(10), 2830.

Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Kohara, H., Yoshimatsu, M., & Takano-Yamamoto, T. (2013). Immunological reaction in TNF-α-mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clinical and Developmental Immunology*, *2013*.

Klingberg, E., Lorentzon, M., Mellström, D., Geijer, M., Göthlin, J., Hilme, E., ... & Forsblad-d'Elia, H. (2012). Osteoporosis in ankylosing spondylitis-prevalence, risk factors and methods of assessment. *Arthritis research & therapy*, *14*, 1-12.

Koritzinsky, E. H., Street, J. M., Star, R. A., & Yuen, P. S. (2017). Quantification of exosomes. *Journal of cellular physiology*, *232*(7), 1587-1590.

Koyuncu, H. (2014). Aksiyal ve periferal spondiloartritlerde erken dönemde tanıya yaklaşım. *Turkiye Klinikleri J PM&R-Special Topics*, *7*(3), 1-8.

Kurian, T. K., Banik, S., Gopal, D., Chakrabarti, S., & Mazumder, N. (2021). Elucidating methods for isolation and quantification of exosomes: a review. *Molecular Biotechnology*, *63*, 249-266.

Kuwabara, T., Ishikawa, F., Kondo, M., & Kakiuchi, T. (2017). The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. *Mediators of inflammation*, *2017*.

Kwok, W. S., & Chung, H. Y. (2022). Review Article on the Relationship between Spondyloarthritis and Osteoporosis. *Journal of Clinical Rheumatology and Immunology*, *22*(02), 54-58.

Landewé, R., Dougados, M., Mielants, H., van der Tempel, V. D. H., & van der Heijde, D. (2009). Physical function in ankylosing spondylitis is independently determined by both disease activity and radiographic damage of the spine. *Annals of the rheumatic diseases*, *68*(6), 863-867.

Laria, A., Lurati, A., Marrazza, M., Mazzocchi, D., Re, K. A., & Scarpellini, M. (2016). The macrophages in rheumatic diseases. *Journal of inflammation research*, 1-11.

Lees, J. R. (2015). Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage. *Cytokine*, *74*(1), 18-26.

Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics*, *7*(3), 789.

Li, Z., & Brown, M. A. (2017). Progress of genome-wide association studies of ankylosing spondylitis. *Clinical & translational immunology*, *6*(12), e163.

Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., & Vlassov, A. V. (2014). Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1652), 20130502.

Li, X., Corbett, A. L., Taatizadeh, E., Tasnim, N., Little, J. P., Garnis, C., ... & Li, I. T. (2019). Challenges and opportunities in exosome research—Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. *APL bioengineering*, *3*(1), 011503.

Liao, H. T., Tsai, C. Y., Lai, C. C., Hsieh, S. C., Sun, Y. S., Li, K. J., ... & Yu, C. L. (2022). The Potential Role of Genetics, Environmental Factors, and Gut Dysbiosis in the Aberrant Non-Coding RNA Expression to Mediate Inflammation and Osteoclastogenic/Osteogenic Differentiation in Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*.

Li-Wearn, K. (2017). Seronegative spondyloarthropathies. *The Singapore Family Physician*, *43*(2), 19-22.

Limón-Camacho, L., Vargas-Rojas, M. I., Vázquez-Mellado, J., Casasola-Vargas, J., Moctezuma, J. F., Burgos-Vargas, R., & Llorente, L. (2012). In vivo peripheral blood proinflammatory T cells in patients with ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology*, *39*(4), 830-835.

Lin, J., Wang, L., Lin, J., & Liu, Q. (2021). The role of extracellular vesicles in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of osteoarthritis. *Molecules*, *26*(16), 4987.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. (2011). *Molecular Cell Biology* (H. Geçkil, H. Özmen, Ö. Yeşilada, Çev). Palme Yayıncılık, Ankara. (2008).

Magrey, M., Yi, E., Wolin, D., Price, M., Chirila, C., Davenport, E., & Park, Y. (2020). Understanding barriers in the pathway to diagnosis of ankylosing spondylitis: results from a US survey of 1690 physicians from 10 specialties. *ACR open rheumatology*, *2*(10), 616-626.

Malochet-Guinamand, S., Pereira, B., Tatar, Z., Tournadre, A., Moltó, A., Dougados, M., & Soubrier, M. (2017). Prevalence and risk factors of low bone mineral density in spondyloarthritis and prevalence of vertebral fractures. *BMC musculoskeletal disorders*, *18*(1), 1-8.

Matsuzaka, Y., & Yashiro, R. (2022). Immune modulation using extracellular vesicles encapsulated with MicroRNAs as novel drug delivery systems. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10), 5658.

McGarry, F., Neilly, J., Anderson, N., Sturrock, R., & Field, M. (2001). A polymorphism within the interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene is associated with ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, *40*(12), 1359-1364.

McHugh, K., & Bowness, P. (2012). The link between HLA-B27 and SpA—new ideas on an old problem. *Rheumatology*, *51*(9), 1529-1539.

McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*, *120*(1), 5-1.

Miao, H. B., Wang, F., Lin, S., & Chen, Z. (2022). Update on the role of extracellular vesicles in rheumatoid arthritis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *24*.

Miller, N. M, Wang, J., Tan, Y., & Dittel, B.N. (2015). Anti-inflammatory mechanisms of IFN-g studied in experimental autoimmune encephalomyelitis reveal neutrophils as apotential target in multiple sclerosis. *Front.Neurosci.,9*:287.

Moon, K. H., & Kim, Y. T. (2014). Medical treatment of ankylosing spondylitis. *Hip & Pelvis*, *26*(3), 129-135.

Moseley, T. A., Haudenschild, D. R., Rose, L., & Reddi, A. H. (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, *14*(2), 155-174.

Narinder, K. & Mehra, G. K. (2003). Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region, *Expert Reviews in Molecular Medicine, 5*,1.

Navajas, R., Corrales, F. J., & Paradela, A. (2019). Serum exosome isolation by size-exclusion chromatography for the discovery and validation of preeclampsia-associated biomarkers. *Proteomics for Biomarker Discovery: Methods and Protocols*, 39-50.

Osta, B., Benedetti, G., & Miossec, P. (2014). Classical and paradoxical effects of TNF-α on bone homeostasis. *Frontiers in immunology*, *5*, 48.

Otieno, B. A., Krause, C. E., & Rusling, J. F. (2016). Bioconjugation of antibodies and enzyme labels onto magnetic beads. In *Methods in enzymology* (Vol. 571, pp. 135-150). Academic Press.

Ou, Y. (2015). Anthrax toxin receptor 2 gene (ANTXR2) rs4333130 is associated with ankylosing spondylitis. *International journal of clinical and experimental medicine*, *8*(5), 7679.

Ozen, G., Deniz, R., Eren, F., Erzik, C., Unal, A. U., Yavuz, S., ... & Atagunduz, P. (2017). Association of, and Polymorphisms with Radiographic Severity of Ankylosing Spondylitis. *The open rheumatology journal*, *11*(1).

Öztürk, Ö. G. (2011). Büyük Doku Uyuşum Kompleksi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *20*(3), 159-167.

Öztürk, K. H., Özbaş, H., Tepebaşı, M. Y., & Koşar, P. (2021). Ankilozan Spondilit Ön Tanılı Hastalarda HLA-B27 Sıklığı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, *12*(3), 364-370.

Pan, C., Stevic, I., Müller, V., Ni, Q., Oliveira-Ferrer, L., Pantel, K., & Schwarzenbach, H. (2018). Exosomal micro RNA s as tumor markers in epithelial ovarian cancer. *Molecular oncology*, *12*(11), 1935-1948.

Pang, S.W. ve Davis, J.C. (2008). Ankilozan Spondilitin Klinik Yönleri (M. Uğur, çev.) Michael H.Weisman, John D. Reveille, Desiree van der Heijde (Ed.), *Ankilozan Spondilit ve Spondiloartropatiler* içinde (s. 145-153). Ankara: Veri Medikal.

Park, J. S., Jang, H. D., Hong, J. Y., Park, Y. S., Han, K., Suh, S. W., ... & Kim, B. T. (2019). Impact of ankylosing spondylitis on depression: a nationwide cohort study. *Scientific reports*, *9*(1), 6736.

Patel, G. K., Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Khushman, M., Singh, S., & Singh, A. P. (2019). Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and *downstream* applications. *Scientific reports*, *9*(1), 1-10.

Pehlivan, Ö. (2013). *Biyolojik tedavi alan aksiyal spondiloartritli hastalarda sigaranın sağlık aktivitesi ve yaşam kalitesine etkisi* [Yayımlanmamış Yan Dal Uzmanlık Tezi]. İstanbul Üniversitesi.

Piszczatowska, K., Czerwaty, K., Cyran, A. M., Fiedler, M., Ludwig, N., Brzost, J., & Szczepański, M. J. (2021). The emerging role of small extracellular vesicles in inflammatory airway diseases. *Diagnostics*, *11*(2), 222.

Poddubnyy, D. (2020). Classification vs diagnostic criteria: the challenge of diagnosing axial spondyloarthritis. *Rheumatology*, *59*(Supplement_4), iv6-iv17.

Pointon, J. J., Harvey, D., Karaderi, T., Appleton, L. H., Farrar, C., Stone, M. A., ... & Wordsworth, B. P. (2010). Elucidating the chromosome 9 association with AS; CARD9 is a candidate gene. *Genes & Immunity*, *11*(6), 490-496.

Pollard, K. M., Cauvi, D. M., Toomey, C. B., Morris, K. V., & Kono, D. H. (2013). Interferon-γ and systemic autoimmunity. *Discovery medicine*, *16*(87), 123.

Popović, M., & de Marco, A. (2018). Canonical and selective approaches in exosome purification and their implications for diagnostic accuracy. *Transl Cancer Res*, *7*, S209-S25.

Pugholm, L. H., Revenfeld, A. L. S., Søndergaard, E. K. L., & Jørgensen, M. M. (2015). Antibody-based assays for phenotyping of extracellular vesicles. *BioMed research international, 2015*.

Qian, Y., Kang, Z., Liu, C., & Li, X. (2010). IL-17 signaling in host defense and inflammatory diseases. *Cellular & molecular immunology*, *7*(5), 328-333.

Raffeiner, B., Dejaco, C., Duftner, C., Kullich, W., Goldberger, C., Vega, S. C., ... & Schirmer, M. (2005). Between adaptive and innate immunity: TLR4-mediated perforin production by CD28 null T-helper cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis research & therapy*, *7*, 1-9.

Ramírez, J., Nieto-González, J. C., Rodríguez, R. C., Castañeda, S., & Carmona, L. (2018, August). Prevalence and risk factors for osteoporosis and fractures in axial spondyloarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Seminars in arthritis and rheumatism, 48*(1), 44-52.

Ranatunga, S., & Miller, A. V. (2014). Active axial spondyloarthritis: potential role of certolizumab pegol. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 87-94.

Reveille, J. D. (2012). Genetics of spondyloarthritis—beyond the MHC. *Nature Reviews Rheumatology*, *8*(5), 296-304.

Reveille, J.D., Brown, M.A. (2008). Ankilozan spondilitin patogenezi (A. Gür, M. Tahtasız, çev.). Weisman, M.H., Reveille, J.D., & Heijde, D. (Eds.) *Ankilozan spondilit ve spondiloartropatiler* içinde. (s.21-37). Ankara: Veri Medikal.

Reveille, J.D., Sims, A.M., Danoy, P., Evans, D.M., Leo, P. et al. (2010). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet, 42:* 123–127.

Rezaiemanesh, A., Abdolmaleki, M., Abdolmohammadi, K., Aghaei, H., Pakdel, F. D., Fatahi, Y., ... & Nicknam, M. H. (2018). Immune cells involved in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *100*, 198-204.

Robinson, P. C., & Brown, M. A. (2012). The genetics of ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. *Rheumatic Disease Clinics*, *38*(3), 539-553.

Robinson, P. C., Leo, P. J., Pointon, J. J., Harris, J., Cremin, K., Bradbury, L. A., ... & Brown, M. A. (2016). Exome-wide study of ankylosing spondylitis demonstrates additional shared genetic background with inflammatory bowel disease. *NPJ genomic medicine*, *1*(1), 1-6.

Rudwaleit, M., Haibel, H., Baraliakos, X., Listing, J., Märker-Hermann, E., Zeidler, H., ... & Sieper, J. (2009). The early disease stage in axial spondylarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Arthritis &*

Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, *60*(3), 717-727.

Rudwaleit, M. V., van der Heijde, D., Landewé, R., Akkoc, N., Brandt, J., Chou, C. T., ... & Sieper, J. (2011). The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Annals of the rheumatic diseases*, *70*(1), 25-31.

Ruiz-López, L., Blancas, I., Garrido, J. M., Mut-Salud, N., Moya-Jódar, M., Osuna, A., & Rodríguez-Serrano, F. (2018). The role of exosomes on colorectal cancer: a review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *33*(4), 792-799.

Rusman, T., van Vollenhoven, R. F., & van der Horst-Bruinsma, I. E. (2018). Gender differences in axial spondyloarthritis: women are not so lucky. *Current rheumatology reports*, *20*(6), 1-12.

Ruyssen-Witrand, A., Luxembourger, C., Cantagrel, A., Nigon, D., Claudepierre, P., Degboe, Y., & Constantin, A. (2019). Association between IL23R and ERAP1 polymorphisms and sacroiliac or spinal MRI inflammation in spondyloarthritis: DESIR cohort data. *Arthritis Research & Therapy*, *21*(1), 1-8.

Safrany, E., Pazar, B., Csöngei, V., Jaromi, L., Polgar, N., Sipeky, C., ... & Melegh, B. (2009). Variants of the IL23R gene are associated with ankylosing spondylitis but not with Sjögren syndrome in Hungarian population samples. *Scandinavian journal of immunology*, *70*(1), 68-74.

Saidane, O., Mahmoud, I., Gafsi, L., Houda, A., Tekaya, R., & Abdelmoula, L. (2018). Factors leading to work absenteeism in Tunisian ankylosing spondylitis patients. *The Egyptian Rheumatologist*, *40*(3), 183-185.

Sarıkaya Pekacar, F. (2015). *Türk ankilozan spondilitli hastalarda HLA-B27 ve MEFV gen mutasyonları arasındaki ilişki* [Yayımlanmamış doktora tezi]. Ankara Üniversitesi.

Schittenhelm, R. B., Sian, T. C. L. K., Wilmann, P. G., Dudek, N. L., & Purcell, A. W. (2015). Revisiting the arthritogenic peptide theory: quantitative not qualitative changes in the peptide repertoire of HLA–B27 allotypes. *Arthritis & rheumatology*, *67*(3), 702-713.

Schinocca, C., Rizzo, C., Fasano, S., Grasso, G., La Barbera, L., Ciccia, F., & Guggino, G. (2021). Role of the IL-23/IL-17 pathway in rheumatic diseases: an overview. *Frontiers in immunology*, *12*, 637829.

Schioppo, T., Ubiali, T., Ingegnoli, F., Bollati, V., & Caporali, R. (2021). The role of extracellular vesicles in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Clinical rheumatology*, *40*(9), 3481-3497.

Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants–past, present and future. *Cytokine & growth factor reviews*, *25*(4), 453-472.

Seldin, M. F. (2015). The genetics of human autoimmune disease: a perspective on progress in the field and future directions. *Journal of autoimmunity*, *64*, 1-12.

Sen, R., Goyal, A., Bansal, P., Hurley, J.A. (2021). Seronegative Spondyloarthropathy. *StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)*. PMID: 29083692.

Shachar, I., & Karin, N. (2013). The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *Journal of leukocyte biology*, *93*(1), 51-61.

Shamji, M. F., Bafaquh, M., & Tsai, E. (2008). The pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Neurosurgical focus*, *24*(1), E3.

Shao, Y., Chen, T., Zheng, X. I., Yang, S., Xu, K., Chen, X., ... & Zheng, S. (2018). Colorectal cancer-derived small extracellular vesicles establish an inflammatory premetastatic niche in liver metastasis. *Carcinogenesis*, *39*(11), 1368-1379.

Sharma, P., Ludwig, S., Muller, L., Hong, C. S., Kirkwood, J. M., Ferrone, S., & Whiteside, T. L. (2018). Immunoaffinity-based isolation of melanoma cell-derived exosomes from plasma of patients with melanoma. *Journal of extracellular vesicles*, *7*(1), 1435138.

Sharip, A., & Kunz, J. (2020). Understanding the pathogenesis of spondyloarthritis. *Biomolecules*, *10*(10), 1461.

Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option?. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6466.

Sidiropoulos, P. I., Hatemi, G., Song, I. H., Avouac, J., Collantes, E., Hamuryudan, V., ... & Dougados, M. (2008). Evidence-based recommendations for the management of ankylosing spondylitis: systematic literature search of the 3E Initiative in Rheumatology involving a broad panel of experts and practising rheumatologists. *Rheumatology*, *47*(3), 355-361.

Sieper, J., Braun, J., Rudwaleit, M., Boonen, A., & Zink, A. (2002). Ankylosing spondylitis: an overview. *Annals of the rheumatic diseases*, *61*(3), 8-18.

Sieper, J., van der Heijde, D. M. F. M., Landewe, R., Brandt, J., Burgos-Vagas, R., Collantes-Estevez, E., ... & Rudwaleit, M. (2009). New criteria for inflammatory back pain in patients with chronic back pain: a real patient exercise by experts from the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS). *Annals of the rheumatic diseases*, *68*(6), 784-788.

Simone, D., Al Mossawi, M. H., & Bowness, P. (2018). Progress in our understanding of the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, *57*(6), 4-9.

Sİndel, D., Esmaeilzadeh, S., & Şen, E. İ. (2012). Romatizmal Hastalıklarda Osteoporozun Etiyopatogenezi. *Turkish Journal of Physical Medicine & Rehabilitation/Turkiye Fiziksel Tip ve Rehabilitasyon Dergisi*, *58*(4).

Smith, J. A., Barnes, M. D., Hong, D., DeLay, M. L., Inman, R. D., & Colbert, R. A. (2008). Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon-γ dysregulation. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *58*(6), 1640-1649.

Snyder, E. A. (2021). Seronegative Spondyloarthropathies. *Clinical Foundations of Musculoskeletal Medicine: A Manual for Medical Students*, 119-132.

Song, J. E., Kim, J. S., Shin, J. H., Moon, K. W., Park, J. K., Park, K. S., & Lee, E. Y. (2021). Role of synovial exosomes in osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. *Cells*, *10*(1), 120.

Stetsko, D., & Sauder, D. N. (2008). IL-12 and IL-23 in health and disease. *Expert Review of Clinical Immunology*, *4*(3), 301-303.

Stolwijk, C., van Onna, M., Boonen, A., & van Tubergen, A. (2016). Global prevalence of spondyloarthritis: a systematic review and meta-regression analysis. *Arthritis care & research*, *68*(9), 1320-1331.

Su, S. S., Wang, S. L., Lu, L. J., & Lin, L. (2016). Association of interleukin-23 receptor gene single nucleotide polymorphisms with ankylosing spondylitis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, *46*(5), 470-473.

Su, W., Du, L., Liu, S., Deng, J., Cao, Q., Yuan, G., ... & Yang, P. (2018). ERAP1/ERAP2 and RUNX3 polymorphisms are not associated with ankylosing spondylitis susceptibility in Chinese Han. *Clinical & Experimental Immunology*, *193*(1), 95-102.

Sudoł-Szopinska, I., & Urbanik, A. (2013). Diagnostic imaging of sacroiliac joints and the spine in the course of spondyloarthropathies. *Polish journal of radiology*, *78*(2), 43.

Sun, L., He, C., Nair, L., Yeung, J., & Egwuagu, C. E. (2015). Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*, *75*(2), 249-255.

Şendur, Ö. F., & AYDENİZ, A. (2001). Spondyloarthropathies Basic Features, Principles of Diagnosis And Treatment. *Meandros Medical And Dental Journal*, *2*(2), 31-35.

Tam, L. S., Gu, J., & Yu, D. (2010). Pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Nature Reviews Rheumatology*, *6*(7), 399-405.

Taser, B., Ayhan, F. F., & Borman, P. (2017). The importance of quality of life for work outcomes in patients with ankylosing spondylitis: a cross-sectional study. *Acta Reumatológica Portuguesa*, *42*(4), 300-309.

Taş, M. N. (2013). *Major histokompatibilite antijen bölgesini temsil ettiği düşünülen (TAG) single nükleotid polimorfizmlerinin HLA-B27'i tanımlamadaki geçerliliğinin değerlendirilmesi* [Yayımlanmamış doktora tezi]. Dokuz Eylül Üniversitesi.

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... & Jovanovic-Talisman, T. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, *7*(1), 1535750.

Tilvawala, K., Kothari, K., & Patel, R. (2018). Sacroiliac joint: A review. *Indian Journal of Pain*, *32*(1), 4.

Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, *164*(6), 1226-1232.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, *3*(2), 133-146.

Tugues, S., Burkhard, S. H., Ohs, I. A., Vrohlings, M., Nussbaum, K., Vom Berg, J., ... & Becher, B. (2015). New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death & Differentiation*, *22*(2), 237-246.

Van Der Lınden, S., Valkenburg,H.A., Cats,A. (1984). Evaluatıon of dıagnostıc crıterıa for ankylosıng spondylıtıs. *Arthritis and Rheumatism, 27*(4), 361-368.

Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M. T., Wesa, A., Parmiani, G., & Anichini, A. (2007). Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clinical Cancer Research*, *13*(16), 4677-4685.

Vitale, R. F., Andrade, F., Ribeiro, Q. (2007). The role of Tumor Necrosis Factor - Alpha (TNF-α) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Rev Bras Otorrinolaringol*, *73*(1), 123-7.

Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*, *10*(1), 45-65.

Wang, C., Liao, Q., Hu, Y., & Zhong, D. A. (2015). T lymphocyte subset imbalances in patients contribute to ankylosing spondylitis. *Experimental and therapeutic medicine*, *9*(1), 250-256.

Wang, M., Xin, L., Cai, G., Zhang, X., Yang, X., Li, X., ... & Pan, F. (2017). Pathogenic variants screening in seventeen candidate genes on 2p15 for association with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population. *Plos one*, *12*(5), e0177080.

Ward, M. M., Deodhar, A., Akl, E. A., Lui, A., Ermann, J., Gensler, L. S., ... & Caplan, L. (2016). American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network 2015 recommendations for the treatment of ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, *68*(2), 282-298.

Watad, A., Bridgewood, C., Russell, T., Marzo-Ortega, H., Cuthbert, R., & McGonagle, D. (2018). The early phases of ankylosing spondylitis: emerging insights from clinical and basic science. *Frontiers in immunology*, *9*, 2668.

Wei, H., Chen, Q., Lin, L., Sha, C., Li, T., Liu, Y., ... & Zhu, X. (2021). Regulation of exosome production and cargo sorting. *International journal of biological sciences*, *17*(1), 163.

Weisman, M. H. (2012). Inflammatory back pain: the United States perspective. *Rheumatic Disease Clinics*, *38*(3), 501-512.

Wenker, K. J., & Quint, J. M. (2022). Ankylosing Spondylitis. *StatPearls [Internet]*. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470173/

Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., & Freund, C. (2017). Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in immunology*, *8*, 292.

Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M. J., & Vader, P. (2018). Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Frontiers in immunology*, *9*, 738.

Withrow, J., Murphy, C., Liu, Y., Hunter, M., Fulzele, S., & Hamrick, M. W. (2016). Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*, *18*(1), 1-12.

Wolf, J. (2012). Clinical features of ankylosing spondylitis. *clinical and molecular advances in ankylosing spondylitis*, 15-26.

Wu, Y., Deng, W., & Klinke II, D. J. (2015). Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*, *140*(19), 6631-6642.

Xi, Y., Jiang, T., Chaurasiya, B., Zhou, Y., Yu, J., Wen, J., ... & Webster, T. J. (2019). Advances in nanomedicine for the treatment of ankylosing spondylitis. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 8521.

Xu, H., Li, B. (2017). Effect of interferon-g polymorphisms on ankylosing spondylitis: A case-control study. *Med Sci Monit, 23*: 4126-4131.

Yan, J., Parekh, V. V., Mendez-Fernandez, Y., Olivares-Villagómez, D., Dragovic, S., Hill, T., ... & Van Kaer, L. (2006). In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *The Journal of experimental medicine*, *203*(3), 647-659.

Yewdell, J. W. (2011). DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends in immunology*, *32*(11), 548-558.

You, K., Gu, H., Yuan, Z., & Xu, X. (2021). Tumor necrosis factor alpha signaling and organogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 727075.

Zacharia, B., & Roy, A. (2019). Ankylosing Spondylitis and Other Seronegative Arthritis. In *Connective Tissue Disease-Current State of the Art*. IntechOpen.

Zenobia, C., & Hajishengallis, G. (2015). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontology 2000*, *69*(1), 142-159.

Zetterberg, H., Smith, D. H., & Blennow, K. (2013). Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nature Reviews Neurology*, *9*(4), 201-210.

Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015). Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, *13*(1), 17-24.

Zhang, B., Zhao, M., & Lu, Q. (2021). Extracellular vesicles in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: functions and applications. *Frontiers in immunology*, *11*, 575712.

Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, *9*(1), 1-18.

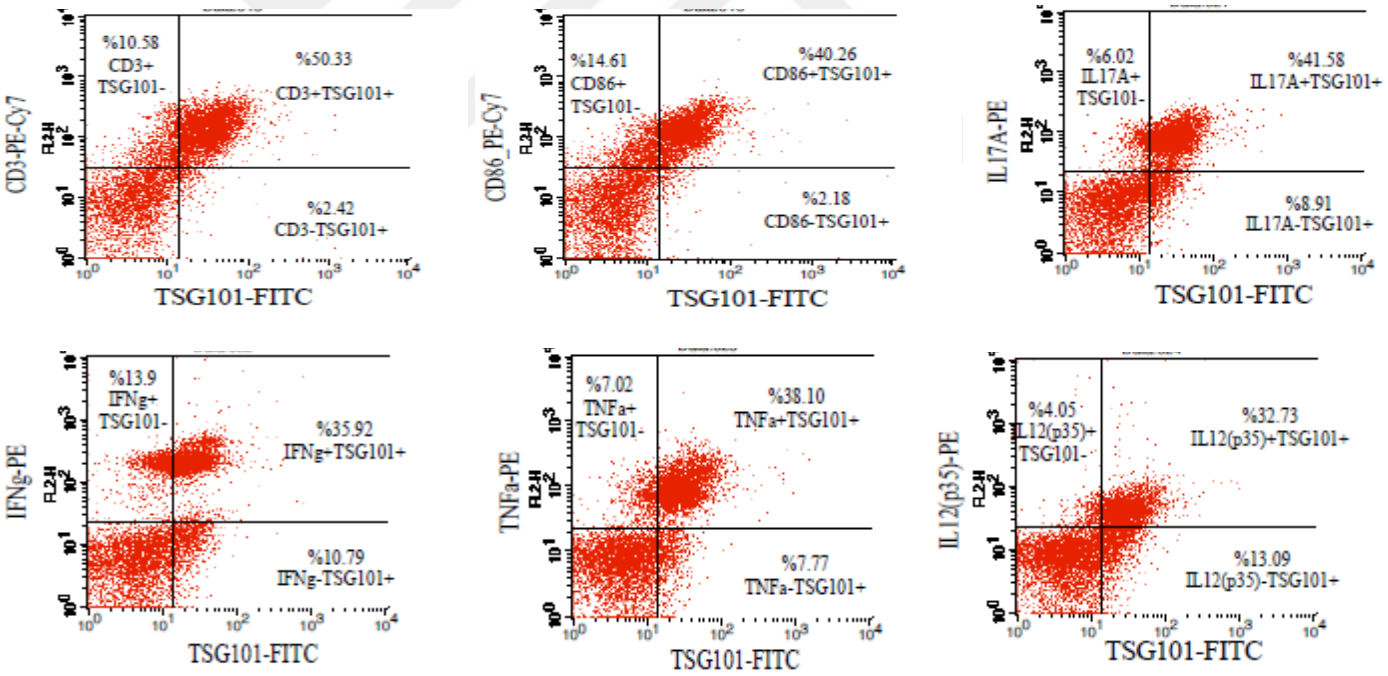
Zhao, B., Grimes, S. N., Li, S., Hu, X., & Ivashkiv, L. B. (2012). TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(2), 319-334.

Zhao, J., Yuan, W., Tao, C., Sun, P., Yang, Z., & Xu, W. (2017). M2 polarization of monocytes in ankylosing spondylitis and relationship with inflammation and structural damage. *Apmis*, *125*(12), 1070-1075.

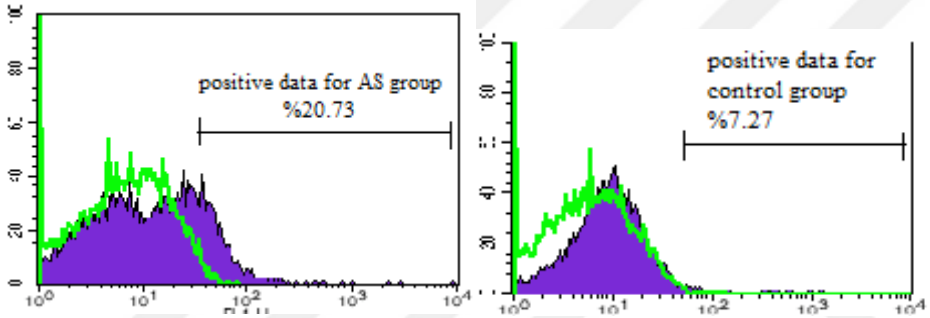
Zhu, W., He, X., Cheng, K., Zhang, L., Chen, D., Wang, X., ... & Weng, X. (2019). Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments. *Bone research*, *7*(1), 1-16.

Zeringer, E., Barta, T., Li, M., & Vlassov, A. V. (2015). Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2015*(4), 319-323.

9. EKLER



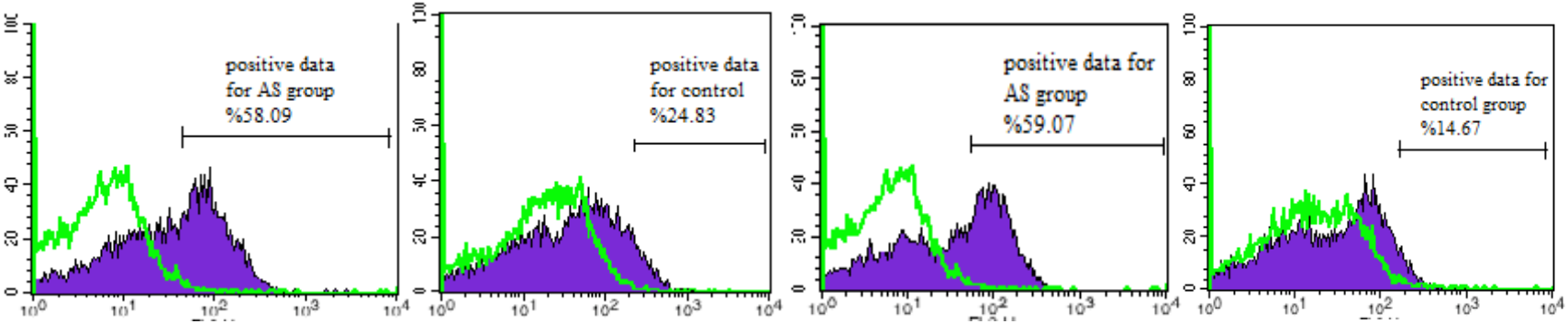
Ek-1: AS sürecinde aktif olan yapıların eksozom olduğunu doğrulayan çift pozitiflik analizi



Ek 2: TSG101+ eksozomlar AS hastalarında kontrollere kıyasla daha fazladır (yeşil: izotip kontrol; lacivert: FITC ile konjuge TSG101 antikorunun ışıması, sol AS grubu için, sağ kontrol grubu için)

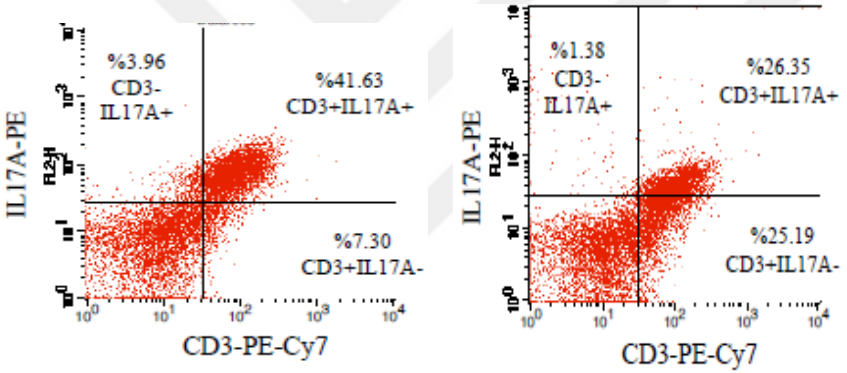
AS grubunda (sol) ve kontrollerde (sağ)
CD3 karşılaştırması

AS grubunda (sol) ve kontrollerde (sağ)
CD86 karşılaştırması

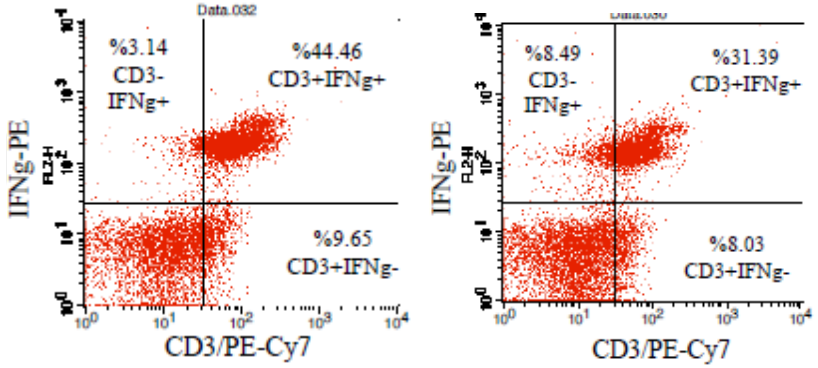


Ek 3: AS sürecinde aktif olan eksozomların kökenini gösteren flow sitometri grafikleri (yeşil: izotip kontrolü; lacivert: PE-Cy7 ile konjuge CD3 ve CD86 antikorlarının ışıması)

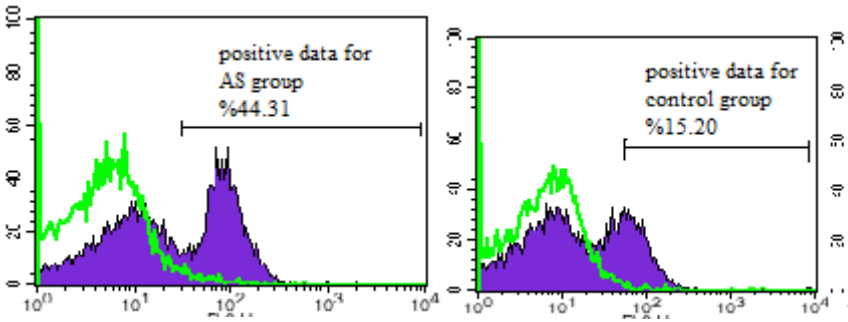
AS grubunda (sol) ve kontrollerde (sağ)
CD3+IL17A+ karşılaştırması



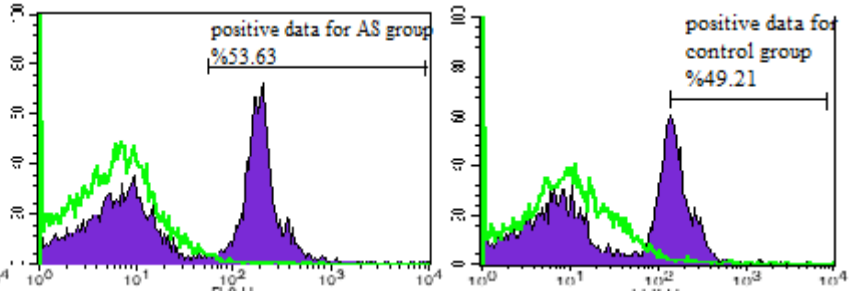
AS grubunda (sol) ve kontrollerde (sağ)
CD3+IFNg+ karşılaştırması



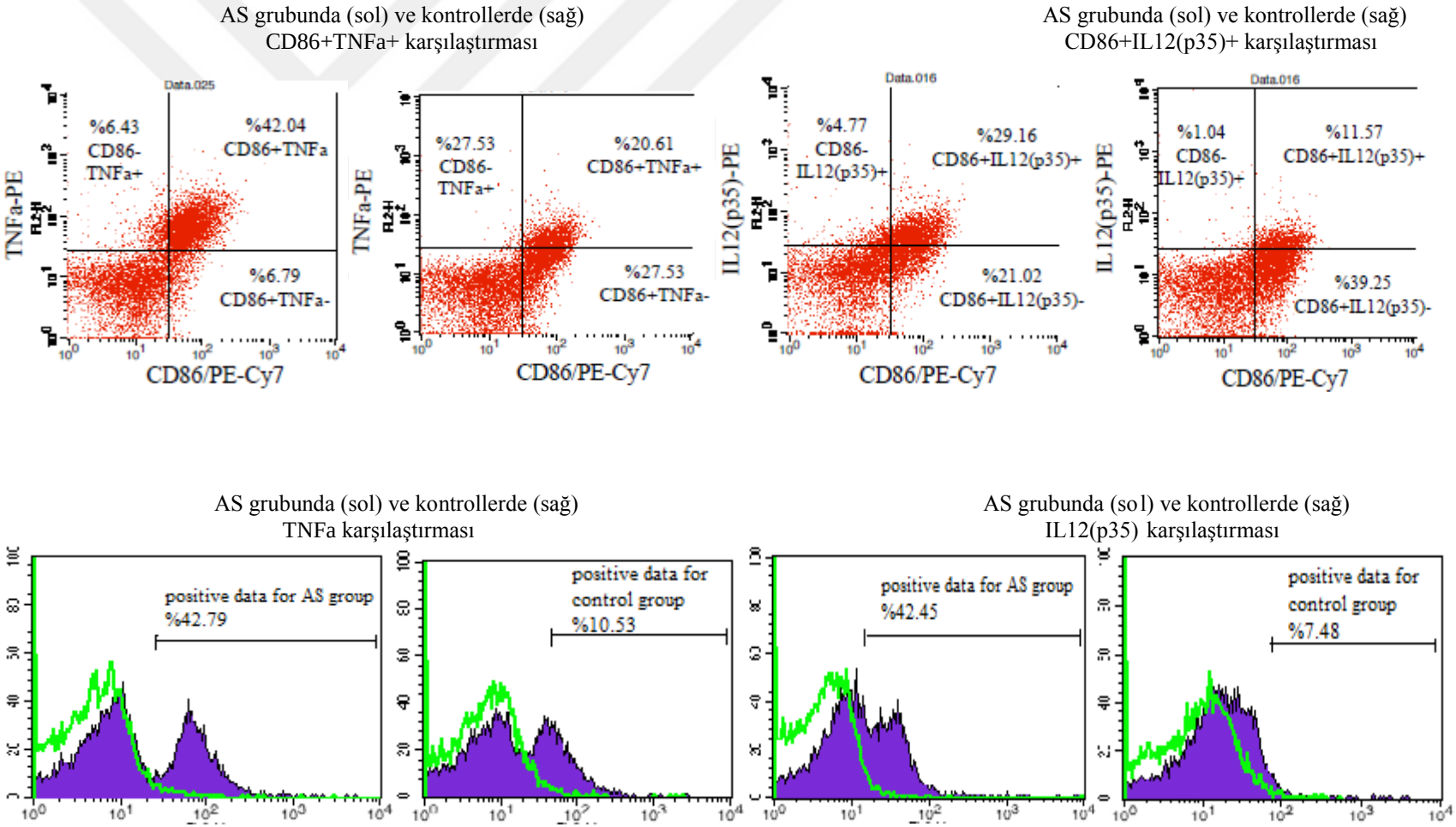
AS grubunda (sol) ve kontrollerde (sağ)
IL-17A karşılaştırması



AS grubunda (sol) ve kontrollerde (sağ)
IFNg karşılaştırması



Ek 4: AS'de eksozomların sitokin profilini gösteren flow sitometrik grafikler (Yukarıdaki nokta grafiklerinde kadranın sağ üst bölgesinde gözlenen floresan ortalamaları T hücresinden türetilen eksozomların yüzeylerinde IL17-A ve IFNg taşıdığını desteklerken, aşağıdaki histogram grafiklerinde yer alan pozitif veriler bu sitokinlerin kontrollere kıyasla AS sürecinde arttığını desteklemektedir.) (yeşil: izotip kontrolü, lacivert: PE ile konjuge IL17A ve IFNg antikorlarının ışıması)



Ek 5: AS'de eksozomların sitokin profilini gösteren flow sitometrik grafikler (Yukarıdaki nokta grafiklerde kadranın sağ üst bölgesinde gözlenen floresan ortalamaları, makrofajlardan türetilen eksozomların yüzeylerinde TNFa ve IL12(p35) taşıdığını desteklerken, aşağıdaki histogram grafiklerinde yer alan pozitif veriler bu sitokinlerin kontrollere kıyasla AS sürecinde arttığını desteklemektedir (yeşil: izotip kontrolü, lacivert: PE ile konjuge TNFa ve IL12-p35 antikorlarının ışıması).

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale:

Karakaya, E., Deniz, R., Abacar, K. Y., Atagündüz, M. P., & Erzik, C. (2023). Exosomes' Profile in Ankylosing Spondylitis: A Preliminary Study. *Erciyes Medical Journal/Erciyes Tıp Dergisi*, *45*(1).

Bildiri :

Karakaya, E.& Erzik, C.(2023, Ocak). Ankilozan Spondilitli Hastalarda Eksozom Profilinin İncelenmesi. 12. Uluslararası İstanbul Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Araştırmalar Kongresi'nde sunulan sözlü bildiri. İstanbul, Türkiye.

Karakaya, E., Deniz, R., Abacar, K. Y., Atagündüz, M. P., & Erzik, C. (2023, Nisan). Ankilozan Spondilitli Hastalarda Eksozom Profilinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi 6. Romatizmal Hastalıklar Sempozyumunda sunulan e-poster bildirisi. İstanbul, Türkiye.