



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA MİKRORNA-204-3P,
MİKRORNA-223-3P, DELTEX1, SİTOTOKSİK T-LENFOSİT İLE İLİŞKİLİ
ANTİJEN GENİ-4'ÜN ÖNEMİ**

RAMİLA HAJİYEVA

**DANIŞMAN
PROF. DR. HAFİZE UZUN**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2022



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir. Proje No: 45004

TEŞEKKÜR

Doktora hayatım boyunca bilimsel bakış açısıyla, akademik duruşuyla daima örnek olarak gördüğüm ve tez çalışmamın gerçekleşmesinde gerekli imkânları sağlayan, araştırmanın planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda değerli bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, tüm yardım ve emekleri için danışman hocam sayın Prof. Dr. Hafize Uzun'a,

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tez sürecimde de destek olan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hüseyin Sönmez'e,

Doktora eğitimim boyunca yetişmemde emekleri geçen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli tüm hocalarına,

Çalışmamızın gerçekleşmesi için yapmış olduğu değerli katkı ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Özgür Kasapçopur'a, Prof. Dr. Remise Gelişgen'e, Doç. Dr. Kenan Barut'a, Doç. Dr. Amra Androviç'e,

Bana her aşamada destek ve yardımcı olan, gösterdiği tüm sabır, özveri ve emeği için Araş.Gör.Sinem Durmuş'a,

Hayatım boyunca her zorlu dönemde ve her mutlu anımda benimle aynı hisleri paylaşan, sabrını ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen ve ilgilerini eksik etmeyen, maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini gördüğüm babam'a ve annem'e,

Varlıklarıyla bana destek sağlayan, büyük bir sabırla yanımda olan ablam Dr. Aşşan Hajiyeva'ya ve kardeşim Uzm.Dr. Elşan Hajiyev'a,

Tez sürecinde varlığı bana en güzel armağan olan, sabrı, desteyi ve en önemlisi de sevgisiyle yanımda olan sözlüm Nasimi Nuriyev'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	iii
BEYAN	iv
TEŞEKKÜRLER.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR.....	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi	3
2.2. Tarihçe	3
2.3. Epidemiyoloji	4
2.4. Etiyopatogenez	5
2.5. Genetik özellikler	7
2.6. Klinik özellikler	8
2.7. Tanı.....	8
2.8. Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi.....	11
2.9. Ayırıcı Tanı.....	11
2.9.1. Tekrarlayan ateş	11
2.9.2. Karın ağrısı.....	12
2.9.3. Artrit/artralji	12
2.9.4. Göğüs ağrısı.....	12
2.9.5. Cilt Lezyonları.....	13
2.9.6. Myalji	13
2.9.7. Vaskülit	14
2.9.8. Hepatomegali ve Splenomegali.....	14

2.9.9. Diğer Klinik Tutulumlar.....	14
2.9.10. Amiloidoz.....	15
2.10. Laboratuvar bulguları	15
2.11. Tedavi	16
2.12. MikroRNA (miRNA).....	18
2.12.1. miRNA'ların Yapısı ve Keşfi.....	18
2.12.2. miRNA'ların Biyogenezi	19
2.12.3. miRNA'ların Fonksiyonu.....	21
2.12.4. miRNA ve AAA.....	21
2.12.5. miRNA-204-3p.....	22
2.12.6. miRNA-223-3p.....	23
2.13. Deltex1 (DTX1)	24
2.14. Sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili antijen geni-4 (CTLA-4)	24
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	26
3.1.1. Çalışma Grupları	26
3.1.1.1. Kontrol Grubu	26
3.1.1.2. Hasta Grubu	26
3.2. Çalışmadan Dışlama Kriterleri	26
3.3. Örneklerin Alınması ve Çalışılan Parametreler	27
3.4. Kullanılan Araç ve Gereçler	28
3.5. Yöntemler	28
3.5.1. miR-204-3p ve miR-223-3p Tayini.....	28
3.5.1.1. Total RNA İzolasyonu	29
3.5.1.2. RNA Miktar Ölçümü	30
3.5.1.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentez	30
3.5.1.4. qPCR (RT-PCR)	32
3.5.1.5. Analiz- $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi	33
3.5.2. Plazma DTX1 Düzeyi Tayini	34
3.5.2.1. Yöntemin Prensibi	34
3.5.2.2. Kullanılan Ayraçlar.....	34
3.5.2.3. Testin Yapılışı	35
3.5.3. Plazma CTLA-4 Düzeyi Tayini	36

3.5.3.1.	Yöntemin Prensibi	36
3.5.3.2.	Kullanılan Ayraçlar.....	37
3.5.3.3.	Testin Yapılışı.....	37
3.5.4.	Plazma Pürin Düzeyi Tayini	38
3.5.4.1.	Yöntemin Prensibi	38
3.5.4.2.	Kullanılan Ayraçlar.....	39
3.5.4.3.	Testin Yapılışı.....	39
3.5.5.	Rutin Test Parametreler için Kullanılan Yöntemler.....	40
3.6.	İstatistiksel Analiz	41
4.	BULGULAR.....	42
4.1.	Tanımlayıcı Özellikler ve Genel Laboratuvar Parametreleri.....	42
4.2.	miR-204-3p ve miR-223-3p Değerlendirmesi.....	45
4.2.1.	Kontrol ve Hasta Grubuna Göre Kat Değişimi ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	45
4.3.	Pürin, CTL-4 ve DTX1 düzeyleri.....	47
4.4.	Korelasyon Analizleri	48
5.	TARTIŞMA	49
6.	KAYNAKLAR	55

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.7.1. Tel Hashomer Tanı Kriterleri	9
Tablo 2.7.2. Yalçınkaya ve arkadaşları tarafından önerilen Türk Pediatrik AAA Kriterleri.....	9
Tablo 2.7.3. Livneh ve arkadaşları tarafından önerilen AAA Tanı Kriterleri	10
Tablo 2.8.1. Pras ve arkadaşlarının önerdiği hastalık ağırlığı skorlaması	11
Tablo 3.5.1.3.1: hsa_miR-204-3p, hsa_miR-223-3p ve hsa_RNU6-6P kit özellikleri .	30
Tablo 4.1.1. Kontrol grubu ve Hasta grubunun cinsiyet dağılımı	42
Tablo 4.1.2. Kontrol grubu ve Hasta grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar sonuçları	43
Tablo 4.1.3. Hasta grubunun hastalık başlangıç yaşı, tanı yaşı ve AAA 50 skoru dağılımı	44
Tablo 4.1.4. Hasta grubunun kullandığı ilaçlar ve dağılımı	44
Tablo 4.1.5. Hasta grubunun mutasyon dağılımı	45
Tablo 4.2.1.1. Kontrol ve hasta grubuna göre hesaplanan miR-204-3p kat değişimleri	46
Tablo 4.2.1.2. Kontrol ve hasta grubuna göre hesaplanan miR-223-3p kat değişimleri	46
Tablo 4.3.1. Kontrol ve Hasta grubunun plazma Pysin, CTL-4 ve DTX1	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.3.1. AAA hastalarında yaygın MEFV mutasyonlarının allel frekansları (%).....	4
Şekil 2.4.1. Pýrin'in yapısı ve etkileşime girdiđi proteinler	5
Şekil 2.12.2.1. MikroRNA'ların biyogenezi	20
Şekil 2.12.6.1. mikroRNA 223'ün kromozomal lokasyonu	23
Şekil 2.14.1. CTLA4 (2q33) genomik alanları	24
Şekil 3.5.2.3.1. Deltex-1 standart eğrisi	36
Şekil 3.5.3.3.1. CTLA-4 standart eğrisi	38
Şekil 3.5.4.3.1. Pýrin standart eğrisi	40
Şekil 4.2.1.1. Hasta grubunun kontrol grubuna göre hesaplanmış kat değişimi	47

KISALTMALAR

- AAA: Ailesel Akdeniz Ateşi
Ago: Argonot
ALT: Alanin aminotransferaz
APC: Antijen sunucu hücre
ASC: Apoptoz ilişkili nokta benzeri protein
AST: Aspartat Aminotransferaz
B: B-kutusu çinko parmak alanı
BASO: Bazofil
bZIP: Bazik lösin fermuarı
CARD: Kaspaz aktivasyon güçlendirme domaini
CRP: C-Reaktif Protein
CTLA-4: Sitotoksik T-Lenfosit Antijen 4
C5a: Kompleman 5a
DTX: Deltex
EOS: Eozinofi
ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı
HCT: Hematokrit
HGB: Hemoglobin
HSP: Henoch Schönlein Purpura
IL: İnterlökin
LYMPH: Lenfosit
MCH: Ortalama eritrosit hemoglobin
MCHC: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
MCV: Ortalama eritrosit hacmi
MEFV: MEditerranean FeVer geni
MONO: Monosit
MPV: Ortalama trombosit hacmi
NEUT: Nötrofil
NFAT: Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü
NF- κ β : Nükleer faktör kappa beta

Ort.: Ortalama
PAN: Poliarteritis Nodosa
PACT: protein kinaz R-aktive edici protein
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PCT: Prokalsitonin
PDW: Trombosit dağılım genişliği
PI3K γ : Fosfoinosit 3-kinaz gama
PKN1: Protein Kinaz N1
PLT: Trombosit
PYD: Pyrin domain
PSTPIP1: Prolin serin treonin fosfataz etkileşimli protein 1
RBC: Eritrosit
RDW: Kırmızı hücre dağılım genişliği
RISC: RNA kaynaklı susturma kompleksi
S.S.: Standart Sapma
SAA: Serum Amiloid A
TAR: Trans Aktivasyon-Duyarlı Bölge
TLR: Toll benzeri reseptör
TNF: Tümör nekroz faktörü
TRBP: Trans Aktivatör RNA bağlayıcı protein
Treg: Regülatör T hücreleri
TRIM: Üçlü Motif
WBC: Lökosit

ÖZET

HAJIYEVA, R. (2022). Ailesel akdeniz ateşi hastalarında mikroRNA-204-3p, mikroRNA-223-3p, deltex1, sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen geni-4'ün önemi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Ailesel Akdeniz ateşi (AAA) dünyada en sık görülen kalıtsal otoinflamatuvar bir hastalıktır. Yeni nesil dizileme birçok yeni varyant tanımladı, ancak bunların klinik ilişkileri büyük ölçüde bilinmiyor ve yorumlanmalarını engelliyor. Teşhis, hastalık şiddetinin değerlendirilmesi ve tedaviye yardımcı olabilecek fonksiyonel testler ve biyobelirteçler geliştirilme aşamasındadır. Bu tez projesindeki amacımız; AAA hastalarında serum miR-204-3p, miR-223-3p, plazma pyrin, deltex (DTX1), CTLA4 düzeylerinin etkinliği değerlendirilerek hastalığın patogenezi ve progresyonu ile ilişkisini araştırmaktır. 48 AAA'li çocuk ve 36 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edildi. Serum miR-204-3p ve miR-223-3p düzeyleri PCR yöntemi ile plazma pyrin, DTX1, CTLA4 düzeyleri sandviç ELISA yöntemi ile ölçüldü. Plazma CTLA4 düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı. Serum miR-204-3p, miR-223-3p, plazma DTX1 düzeyleri AAA hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunurken, plazma pyrin düzeyleri ($p<0.05$, tümünde) anlamlı yüksek bulundu. CTL-4 düzeyleri ile pyrin ve DTX1 düzeyleri arasında pozitif korelasyon ($r=0,602$, $p<0,001$; $r=0,740$, $p<0,001$, sırasıyla) bulundu. Çalışmamızın bu sonuçları doğrultusunda, miR-204-3p ve miR-223-3p AAA patogenezinde etkili olabilir. MEFV genini kodlayan pyrin proteininin plazma düzeylerinin artması apoptotik ve inflamatuvar sinyal yollarında önemli bir rolü olabilir. Pyrinin artması FMF mutasyonları varsayılan pyrin inflamazomlarının sensitivelerini arttırabilir. DTX1 düzeylerinde azalma, DTX1 ve CTL-4 arasında pozitif korelasyon AAA hastalarında ataksız dönemlerde de subklinik inflamasyonun devam edebildiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ailesel Akdeniz ateşi, miR-204-3p, miR-223-3p, deltex1, sitotoksik T-lenfosit antijen4, hastalık aktivitesi, enflamasyon.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 45004.

ABSTRACT

HAJIYEVA, R. (2022). Importance of microRNA-204-3p, microRNA-223-3p, deltex1, cytotoxic t-lymphocyte-associated antigen gene-4 in familial Mediterranean fever patients. Istanbul University-Cerrahpaşa Graduate School of Education, Department of Medical Biochemistry. Doctoral Thesis. Istanbul.

Familial Mediterranean fever (FMF) is the most common inherited autoinflammatory disease in the world. Next-generation sequencing has identified many novel variants, but their clinical relevance is largely unknown, precluding their interpretation. Diagnosis, assessment of disease severity, and functional tests and biomarkers that may aid treatment are under development. Our aim in this thesis project is to evaluate the efficacy of serum miR-204-3p, miR-223-3p, plasma pyrin, deltex (DTX1), CTLA4 levels in FMF patients and to investigate their relationship with the pathogenesis and progression of the disease. 48 children with FMF and 36 healthy children were included in the study. Serum miR-204-3p and miR-223-3p levels were measured by PCR method and plasma pyrin, DTX1, CTLA4 levels were measured by sandwich ELISA method. There was no statistical significance between the groups in plasma CTLA4 levels. Serum miR-204-3p, miR-223-3p, plasma DTX1 levels were found to be significantly lower in FMF patients compared to the control group, while plasma pyrin levels ($p < 0.05$, in all) were significantly higher. A positive correlation was found between CTL-4 levels and pyrin and DTX1 levels ($r = 0.602$; $p < 0.001$; $r = 0.740$; $p < 0.001$, respectively). In line with these results of our study, miR-204-3p and miR-223-3p may be effective in the pathogenesis of FMF. Increased plasma levels of the pyrin protein encoding the MEFV gene may have an important role in apoptotic and inflammatory signaling pathways. Increasing pyrin may increase the sensitivity of putative pyrin inflammasomes as FMF mutations. A decrease in DTX1 levels and a positive correlation between DTX1 and CTL-4 suggest that subclinical inflammation may continue in attack-free periods in FMF patients.

Keywords: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, deltex1, disease activity, Familial Mediterranean fever, inflammation, miR-204-3p, miR-223-3p.

This study was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University-Cerrahpaşa. Project Number: 45004.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailesel Akdeniz ateşi (AAA), 'periyodik peritonit', 'ailesel paroksizmal poliserozit', 'periyodik hastalık', 'Siegal-Cattan-Mamou hastalığı', 'Wolff periyodik hastalığı' veya 'Reimann sendromu' olarak da bilinen otoinflamatuar genetik bir hastalıktır. AAA, esas olarak Akdeniz kökenli insanları etkileyen otozomal resesif geçiş gösteren genetik bir bozukluktur. AAA, çocuklukta erken dönemde ağrılı ataklara yol açan tekrarlayan ateş ve serozit (göğüs, karın, eklemler) atakları ile karakterizedir. İlk atak sıklıkla çocuklukta ortaya çıkar ve genellikle 20 yaşından önce başlar. Tüm ataklar 2-4 saat arasında gelişir ve 6 saat ila 4 gün arasında sürer. Bazen bir döküntü veya baş ağrısı eşlik eder. Amiloidoz, AAA'nin en ölümcül komplikasyonudur. Erken teşhis ile kolşisine başlanması ataklarda düzelme sağlar ve amiloidozu önler (1-5).

Genetik bir hastalık olan AAA'den sorumlu gen, kromozom 16'nın (16 p13.3) kısa kolunda bulunan Mediterranean FeVer (MEFV) genidir. MEFV geni, pyrin proteinini kodlar. MEFV geninin AAA'ne yol açabilecek yaklaşık 300 farklı mutasyonu tanımlanmıştır. Pyrin, 781 amino asit içeren bir protein olup AAA'nin patofizyolojisinde rol oynadığına inanılmaktadır. Pyrin esas olarak lökositler de dahil olmak üzere dolaşım hücrelerinin hücre iskeletinde bulunur. Lökositler, patojenlere karşı bir bağışıklık tepkisi oluşturmaktan sorumludur. Pyrin proteininin tam yapısı, işlevi ve AAA'de inflammatuar bir yanıt oluşturmadaki rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır. Olası bir hipotez, pyrinin apoptoz ilişkili nokta benzeri protein (ASC) ve kaspaz-1'e bağlanmasıdır. Bu bağlanma, interleokin-1beta (IL-1 β) aktivasyonunu ve dolayısıyla inflammatuar yolakları inhibe eder. MEFV genlerinin mutasyonu, pyrin proteinini ve işlevini bozar, bu da IL-1 β 'nin ve ardından tüm inflammatuar yolun aktivasyonuna yol açar (34, 37, 154-156).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kısa, tek sarmallı RNA molekülleridir. miRNA'ların keşfi, malign, bulaşıcı ve otoimmün mekanizmalar gibi biyolojik süreçleri anlamada devrim yarattı ve epigenetik alanının gelişimine katkıda bulundu (160,161). AAA hastalarında miR-107, let-7d-5p ve miR-148b-3p down-regüle ve miR-144-3p, miR-21-5p, miR-4454 ve miR-451a düzeylerinin up-regüle olduğu bildirildi. miR-107 ve miR-148, AAA hastalarında down-regüle edilirken, miR-21 up-regüle edilir ve ataksız dönemde bile AAA hastalarının doğuştan gelen bağışıklık sistemi-

nin genel bir proinflatuar profilini gösterir. En önemlisi, tüm bu miRNA'ların bağışıklık süreçlerinde yer aldığı bildirilmiştir (216). AAA hastalığı ile ilişkili olabilecek miR-223 düzeylerinin hastalarda anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (217).

Deltex (DTX1), prolin bakımından zengin bir motif içeren ubikuitin E3 ligazdır. Farelerde DTX1 delesyonunun, T hücrelerinin ve lupus benzeri otoimmün sendromların hiperaktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Ancak insan otoimmün hastalıkları ile ilişkisi kesin olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda T hücre fonksiyonunun negatif regülatörü olabileceği önerilmektedir. Bu etkisini IFN- γ üretimini arttırarak gösterdiği öne sürülmektedir (231).

T hücresi aktivasyonunda kritik bir kontrol noktası olan sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili antijen geni-4 (CTLA4), birçok otoimmün hastalığa neden olmuştur. CTLA-4 molekülü, T hücresi aktivasyonu üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahiptir ve antijen sunan hücrelerde ligand CD80 / 86 ile etkileşimleri yoluyla CD28'e bağımlı T hücresi aktivasyonunu bloke ederek immün toleransın korunmasına katkıda bulunur (232-234).

Bu tez projesindeki amacımız; AAA patogenezinde CTLA4 ve bu molekülü kodlayan geni hedef alan miR-223-3p ve DTX1 ile kodlayıcı genini hedef alan miR-204-3p'nin yer alıp almadığını belirlemektir. Söz konusu çalışma bu moleküllerin AAA ile ilişkisini ortaya koyarak AAA'da bu miRNA'ların olası mekanizmalarını açıklamaya yönelik ilk çalışma olacaktır. Böylelikle hem AAA patogenezinin daha iyi açıklanmasına katkı sağlayacağını hem de yeni terapötik yaklaşımlar için hedef oluşturacağı ön görülmektedir. Bu hipotez doğrultusunda çalışmada AAA hastalarında serum miR-204-3p, miR-223-3p, plazma pyrin, CTLA4 ve DTX1 düzeylerini belirleyerek bu parametrelerin hastalığın patogenezi ve progresyonunda non-invaziv, daha hassas ve özgün biyobelirteçler olarak klinikte kullanılabilme olasılıklarını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi

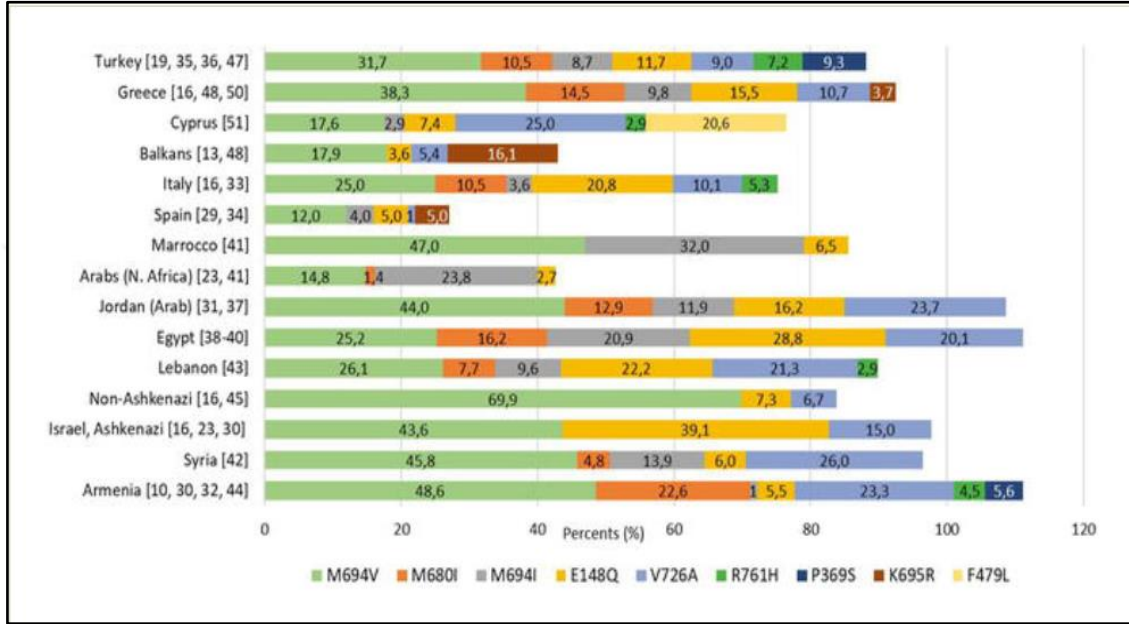
Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA), periton, plevra veya sinovyal membranların inflamasyonu ile karakterize, genellikle ateş ve kas ağrılarının eşlik ettiği, 6-96 saat süren ve tekrarlayan ataklarla ilerleyen otozomal resesif geçişli otoinflamatuvar bir hastalıktır. Özellikle Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar gibi Akdeniz çevresindeki topluluklarda yaygındır (1-3). AAA hastalarının yaklaşık %90'ında klinik semptomlar 20 yaşından önce ortaya çıkmaktadır (4).

2.2. Tarihçe

AAA hastalığının bilinen ilk tanımı 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından yapılmıştır ve hastalık 1945 yılına kadar tanımlanmamıştır. 1945 yılında hastalık; Siegal'in kendisinde ve Amerika'nın New York şehrinde yaşayan 10 Aşkenazi Yahudisinde aynı klinik tabloyu tespit etmesi üzerine bir kez daha Benign Paroksizmal Peritonit olarak tanımlandı (5-8). Hastalığın ailesel olduğu ve ayrıca amiloid birikiminin görüldüğü ilk kez 1952 yılında Mamou ve Cattan adlı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (9). 1955-1958 yıllarında Helter tarafından ayrıntılı bir tanım yapılmış ve 1958 yılında Helter ve Sohar tarafından "ailesel 4 Akdeniz ateşi" tanımı kullanılmıştır. Ayrıca bu araştırmacılar 1961 yılında hastalığın genetiğinin otozomal resesif kalıtıldığını bildirmişlerdir (10-12). İlk kez 1972 yılında Goldfinger tarafından kullanılmaya başlanan kolşisinin günlük kullanımı, hastalığın sıklığını, şiddetini ve süresini önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca en önemli ölüm nedeni olarak gösterilen amiloidoz insidansında kolşisin kullanımı ile azalma gözlenmiştir (13,14). Daha sonra 1992 yılında 16. kromozomun kısa kolunda bölgesi gösterilen (16p13.3) MEditerranean FeVer geni (MEFV geni) 1997 yılında iki farklı konsorsiyum tarafından eş zamanlı olarak bulunmuştur. Bu genin isimlendirmesi baş harflerinden oluşmaktadır. 4 "MEditerranean FeVer" kelimelerinden MEFV geni olarak isimlendirilmiştir (15,16).

2.3. Epidemiyoloji

AAA birçok etnik grupta tespit edilse de en sık Akdeniz bölgesinde görülmektedir. Araplarda, Türklerde, Ermenilerde, Rumlarda, İtalyanlarda, Kuzey Afrikalı Yahudilerde (Fas, Cezayir, Tunus) ve Doğu Avrupa Yahudilerinde çok yaygındır (*Şekil 2.3.1.*) (17-20).



Şekil 2.3.1: AAA hastalarında yaygın MEFV mutasyonlarının allel frekansları (%)

Türkiye, AAA sıklığının en yüksek olduğu bölgelerden biridir. Prevalansı yaklaşık 1/400-1/1000 olarak belirlenmiş olup, yaklaşık 100.000 AAA hastası olduğu düşünülmekte ve taşıyıcılık oranı 1/5 olarak bildirilmektedir (21). İsrail'de 1/1000'den biraz daha fazla ve Ermenilerde yaklaşık 1/1500'den biraz daha sık görülmektedir (18,22).

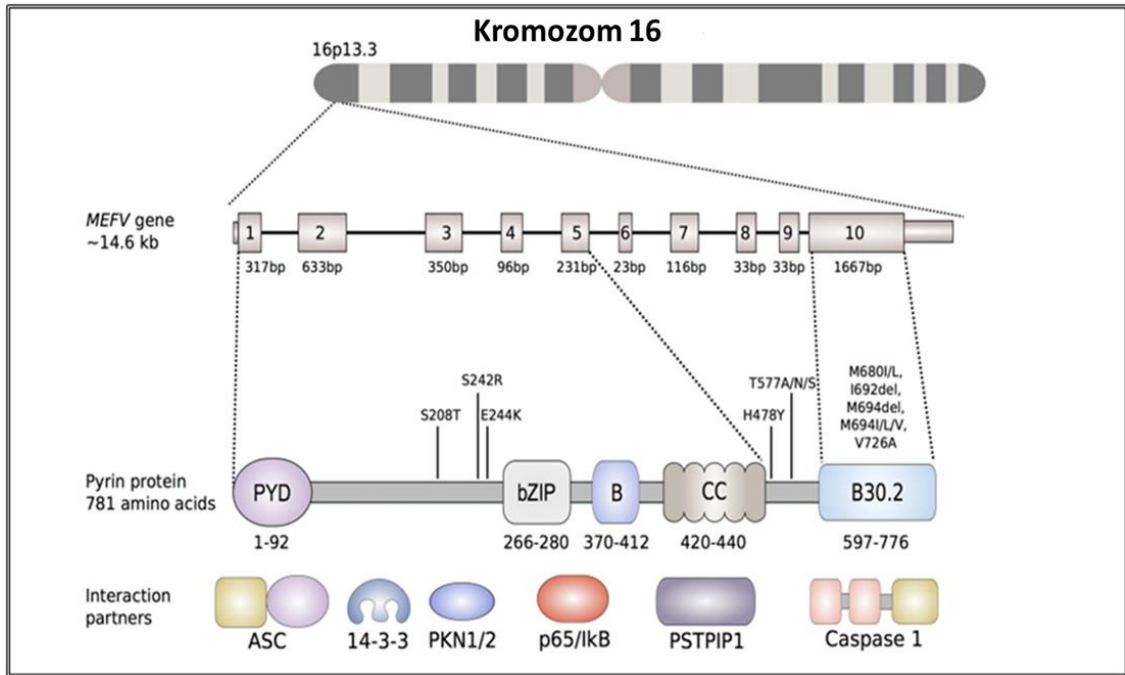
Ülkemizde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda MEFV genindeki varyantların varlığına göre hesaplanan taşıyıcılık oranları farklı değerlere sahiptir. Orta Anadolu bölgesinde 100 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada %20, Karadeniz bölgesinde 100 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada ise %27 gibi yüksek taşıma oranları saptanmıştır (23-28). Güneydoğu Anadolu bölgesinde 667 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada %3,8 taşıyıcılık oranı bulunmuştur (29).

Otozomal resesif geçişli bir hastalık olan AAA, daha çok akraba evliliğinin yaygın olduğu bölgelerde görülmektedir. Hastaların %90'ı 20 yaşındadır; yarısı 10 yaşından küçük. Semptomlar yaşamın ilk yıllarında bile ortaya çıkabilir. Türk toplumunda ortalama hastalık başlangıç yaşı 9,5, ortalama tanı yaşı 16,5'tir (27,30). Kırk yaşından sonra

başlangıç çok nadirdir (31). Kız ve erkek çocuklar arasındaki ilişkiye bakıldığında pediatrik yaş grubunda AAA hastalığının genel olarak her iki cinsiyette eşit olarak dağıldığı görülmektedir (31,32).

2.4. Etiyopatogenez

AAA'ya MEFV geni mutasyonları neden olur. MEFV geni, Amerikalıların pyrin (ateş düzenleyici protein anlamına gelen Latince 'pyrexia'dan) ve Fransızların marenostin (Akdeniz'in eski adı, Latince Mareo nostrumdan) adını verdiği bir proteini sentezler (11,33).



Şekil 2.4.1: Pyrin'in yapısı ve etkileşime girdiği proteinler

PYD: Pyrin domain; **B:** B-kutusu çinko parmak alanı; **bZIP:** bazik lösin fermuarı (basic leucine ZIPper); **PSTPIP1:** Prolin serin treonin fosfatiz etkileşimli protein, **PKN1/2:** Protein kinazlar PKN1 ve PKN2; **ASC:** Kaspaz alım alanı içeren apoptozla ilişkili benek benzeri protein

Pyrin, 86 kDa arginin ve lizin amino asitlerinden zengin, 781 amino asitten oluşan pozitif yüklü bir proteindir (**Şekil 2.4.1**) (34-37). Esas olarak polimorfonükleer hücrelerde, sitokinle aktive olan monositlerde, dendritik hücrelerde ve sinovyal fibroblastlarda bulunur (38). Bu proteinin anti-inflamatuar bir işlevi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle meydana gelen mutasyonlar, fonksiyon kaybı ile pyrin proteininin sentezlenmesine ve inflamasyondaki baskılayıcı rolünü yerine getirememesine neden olur (26). Pyrin proteini

yapısal olarak 5 fonksiyonel bölgeye sahiptir (*Şekil 2.4.1*).

Bu bölgeler;

- Pysin (PyD, PAAD veya DAPIN),
- bZIP,
- B-kutusu çinko parmak,
- Alfa sarmalı,
- B30.2.

Her bölgenin farklı bir işlevi vardır. Örneğin; pyrin parçası (PyD bölgesi), Apoptozis nokta benzeri protein (ASC) bir Kaspaz güçlendirme bölgesi (CARD) proteini ile etkileşime girerek interleukin (IL)-1 β aktivasyonunu inhibe eder (39-41). Bunun dışında bazik lösin fermuarı (bZIP) bölgesi nükleer faktör kappa beta aktivasyonunu sağlar (39-42). Pysin yapısı ve etkileşime girdiği proteinler (43) Üç Parçalı Motif Ailesi (TRIM) proteinlerle etkileşime giren ve viral enfeksiyonlara karşı koruyucu etkiye sahip olan alfa sarmal bölgesidir (44). MEFV gen ekzonları ve pyrin protein yapısı (45) sonuç olarak mutasyona uğramış pyrin proteininin varlığı konak savunmasında, ateş patogeneğinde ve inflamasyonda ve kontrolsüz IL-1 β sekresyonunda anahtar rol oynayan IL-1 β üretiminde artışa neden olur. AAA ataklarına neden olur. AAA'nın atak döneminde C-Reaktif Protein (CRP) ve serum amiloid A (SAA) (46) gibi akut faz reaktanlarında artış olduğu gösterilmiştir.

Günümüzde kabul edilen bir diğer önemli hipotez ise atakların inflamatuvar yanıtın düzenlenmesindeki bir bozukluktan kaynaklandığıdır. Normal olarak, peritoneal ve sinovyal sıvılar, kompleman 5a (C5a) fragmanının kemotaktik aktivitesini inhibe eden bir inhibitör protein içerir. C5a önemli bir inflamatuvar aracıdır ve nötrofiller için güçlü bir kemotaktik etkiye sahiptir. C5a inhibitör proteini, güçlü bir proinflamatuvar sitokin olan hem C5a hem de IL-8'i inhibe eder. AAA hastalarının eklem ve periton sıvısında C5a inhibitör proteinin yetersiz olduğu ve bu nedenle inflamasyon oluşabileceği öne sürülmüştür (26,47,48). Sonuç olarak konak savunmasında, inflamasyonda ve ateş patogeneğinde anahtar rol oynayan IL-1 β üretimi, mutant pyrin proteininin varlığı ile artar ve kontrolsüz IL-1 β salınımı AAA ataklarına neden olur. AAA semptomların ataklarda

ortaya çıkmasının, mutant pyrin proteininin stres sırasında işlevini yerine getirememesi sonucu dengenin inflamasyon lehine bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Barakat ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, katekolamin deşarjı sempatomimetik bir ajanla sağlandığında ortaya çıkan bulgular, AAA ataklarına benzemekte ve kolşisin tedavisinden yarar bu teoriyi desteklemektedir (49).

2.5. Genetik Özellikleri

AAA, monogenik kalıtım gösteren otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. 16. Kromozomun (16p13.3) kısa kolunda lokalize olan MEFV geni 3505 nükleotid ve 10 ekzondan oluşur (6,33,50,51). Bugüne kadar MEFV geninde 335 tip mutasyon gösterilmiştir (52). Genellikle nokta mutasyonlar olarak görülür ve mutasyonların çoğu ekzon 2, 3, 5 ve özellikle 10'dadır. Bu mutasyonların çoğu yanlış anlamlı mutasyonlardır (3). AAA hastalığında sıklıkla görülen Missense mutasyonları ve M694V, M680I ve V726A mutasyonları MEFV geninin 10. ekzonunda yer alır. Yapılan çalışmalarda Türk AAA hastalarında MEFV geninde en sık saptanan mutasyon oranı; M694V için %51,55, M680I için %9,22, E148Q için %3,55, V726A için %2,88 ve M694I için %0,44 (18,33,35,53-56). Son çalışmalar ekson 2 mutasyonu olarak bilinen R202Q değişikliğinin AAA hastalarında da oldukça yaygın olduğunu göstermiştir. Sağlıklı popülasyon ile AAA hastaları arasında R202Q değişikliği insidansını karşılaştıran çalışmalarda, AAA hastalarında R202Q değişiminin daha sık olduğu saptanmıştır (57). 199 hastanın demografik özelliklerini ve mutasyonlarını değerlendiren bir çalışmada, R202Q mutasyonu M694V'den sonra en sık görülen ikinci mutasyon olarak öne çıkmaktadır (58).

MEFV allellerinde bulunan mutasyonlara göre üç farklı fenotip tanımlanmıştır:

1-Fenotip I (Önemli AAA): Çok çeşitli hastalıkla ilgili semptomları ve M694V mutasyonu başta olmak üzere birçok mutasyonu olan hastalar.

2-Fenotip II (İzole amiloidoz): İlk veya tek semptom olarak amiloidozlu hastalarda M694V mutasyonu çok yaygındır. Bu hastaların serumunda SAA proteini sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu hastalarda subklinik inflamasyon varlığını ve akut atak olmaksızın amiloidoz ve nefrotik sendrom gelişimini açıklamaktadır.

3-Fenotip III (Preklinik AAA): Klinik belirti ve semptom göstermeyen ancak

homozigot veya kombine heterozigot MEFV mutasyon taşıyıcıları olan ve sessiz durumda olanlar. E148Q ve V726A mutasyonları çoğunlukla bu fenotipte bulunur. Bu kategorideki insan sayısı diğer iki kategoriden çok daha fazladır ve etnik köken bu fenotipin ortaya çıkışını etkilemektedir (59,60).

2.6. Klinik Özellikleri

Bir çocukluk hastalığı olarak bilinen AAA, tipik olarak, periton, plevra, eklem (veya deri) içeren tekrarlayan ateş ve iltihaplanma atakları ile kendini gösterir (61). Hastaların %90'ında 20 yaşından önce; %75'inde ilk belirtileri 10 yaşından önce görülmeye başlar (62,63). Türkiye'de AAA tanısı almış geniş bir hasta popülasyonu ile yapılan bir çalışmada, semptomların ortalama 9,6 yaşında başladığı ve hastaların ortalama 16.4 yaşında tanı aldığı görülmüştür (4,12,27,30). Atak süresi genellikle 2-4 gün arasında değişmekle birlikte daha uzun veya daha kısa ataklar da görülebilir. Tetikleyici faktörler tam olarak bilinmemekle birlikte enfeksiyonların veya stresin etkili rol oynadığı düşünülmektedir. Ataklar genellikle herhangi bir semptom olmadan aniden başlar ve daha sonra kendi kendine sona erer. Bazı hastalarda sinirlilik, baş dönmesi, iştah artışı, tat alma duyusunda değişiklik gibi çeşitli duyuşsal ve fiziksel şikayetler atakların habercisi olabilir. Ataklar sırasındaki klinik bulgular çeşitli şekillerde olabileceği gibi en sık görülen atak tipi de olabilir; ateş, karın ağrısı ve eklem bulgularının bir arada olduğu bir atak şeklidir (12,21,64,65). En sık görülen nöbet tipi ateş, karın ağrısı ve eklem semptomlarının bir arada olmasıdır (65).

2.7. Tanı

AAA'yı teşhis etmek için kullanılabilecek spesifik bir test olmadığından klinik tanı kuraldır. Tanı, 4 farklı grup tarafından önerilen tanı kriterlerinden birine dayandırılabilir. Bunlar; En yaygın olarak kullanılan 'Tel Hashomer' kriterleri (**Tablo 2.7.1**), Türk pediatrik kriterleri ve yakın zamanda önerilen "Eurofever/PRINTO" ('Eurofever': Avrupa menşeli bir otoinflatuar hasta kayıt sistemi, PRINTO (Pediatric Rheumatology International Trials Organisation) (**Tablo 2.7.2**), Livneh kriteri (**Tablo 2.7.3**) kriterlerdir (1,48,62,64,66-68).

Tablo 2.7.1. Tel Hashomer Tanı Kriterleri

Major Kriterler	Minör Kriterler
1 Serözitin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları	Tekrarlayan ateş atakları
2 Yatıklaştırıcı bir hastalık olmaksızın AA tipi amiloidoz varlığı	Erizipel benzeri eritem varlığı
3 Kolşisin tedavisine anlamlı yanıt alınması	Birinci derece akrabalarında AAA varlığı
Kesin tanı: 2 major kriter veya 1 major + 2 minör kriter	
Olası tanı: 1 major + 1 minör kriter	

Tablo 2.7.2. Yalçınkaya ve arkadaşları tarafından önerilen Türk Pediatrik AAA Tanı Kriterleri

Kriter	Açıklama
1. Ateş	Aksiler vücut ısısı > 38°C, 6-72 saat süren, ≥ 3 atak
2. Karın ağrısı	6-72 saat süren, ≥ 3 atak
3. Göğüs ağrısı	6-72 saat süren, ≥ 3 atak
4. Artrit	6-72 saat süren, ≥ 3 atak, oligoartrit
5. Aile öyküsü	
Kesin tanı için en az 2 kriter bulunmalıdır.	

Tablo 2.7.3. Livneh ve arkadaşları tarafından önerilen AAA Tanı Kriterleri

Major Kriterler	Minör Kriterler
1-4'teki tipik ataklar	
1. Peritonit (generalize)	1. İnkomples göğüs atakları
2. Plevrit (tek taraflı) veya perikardit	2. İnkomples artrit atakları
3. Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği)	3. Egzersizle bacak ağrısı
4. Tek başına ateş	4. Kolşisine iyi yanıt
5. İnkomples abdominal ataklar	
Destekleyici kriterler	
1. Ailede AAA öyküsü	8. Lökosit, ESR, SAA, fibrinojen düzeylerinden bir veya daha fazlasında patolojik sonuçlar ile seyreden geçici inflamatuvar yanıt
2. Uygun etnik köken	9. Aralıklı proteinüri, hematüri
3. 20 yaşından önce başlaması	10. Appendektomi veya tanısal laparotomi
4. Ağır, yatak istirahati gerektiren atak	
5. Kendiliğinden geçmesi	
6. Ataklar arası bulgusuz dönem	
7. Ailede akraba evliliği öyküsü	
Tipik ataklar	İnkomples ataklar
1. Tekrarlayıcı (aynı yerde 3'ten çok)	Aşağıda belirtilen özelliklerden birisi veya ikisi bakımından tipik ataklardan farklı, ağrılı ve tekrarlayıcı ataklardır
2. Ateşli (rektal, 38 derece veya daha yüksek)	1. Normal veya 38°C'den düşük ateş
3. Kısa süreli (12 saat-3 gün) nöbetlerdir.	2. Klasik nöbetlerden daha uzun veya daha kısa nöbetler
	3. Abdominal ataklar esnasında peritonit bulgularının olmaması
	4. Lokalize abdominal ataklar
	5. Spesifik yerlerden başka yerleri tutan artrit
Kesin tanı için;	
1 veya daha fazla majör ölçüt veya	
2 veya daha fazla minör ölçüt veya	
1 minör, 5 veya daha fazla destekleyici ölçüt veya	
1 minör ölçüt ile birlikte destekleyici ölçütlerden ilk 4 tanesinin varlığı gerekmektedir.	

2.8. Hastalık Şiddetinin Değerlendirilmesi

Günümüzde, Pras ve arkadaşlarının skorlaması en yaygın olarak AAA şiddetinin değerlendirilmesinde kullanılır (**Tablo 2.8.1**) (69-71). Bu skorlama sistemi pediatrik hastalar için yeniden düzenlenmiş ve kolşisin dozunun yaşa uygunluğuna göre skorlanması önerilmiştir (72,73).

Tablo 2.8.1. Pras ve arkadaşlarının önerdiği hastalık ağırlığı skorlaması

Parametre	Özellik	Puan
Başlangıç yaşı (yıl)	>31	0
	21-31	1
	11-20	2
	6-10	3
	<6	4
Aylık atak sayısı	<1	1
	1-2	2
	>2	3
Artritin özelliği	Akut	2
	Uzamış	3
Erizipel benzeri eritem varlığı		2
Amiloidoz varlığı		3
Kolşisin dozu (mg/gün)	1	1
	1,5	2
	2	3
	>2	4
Pediatrik hasta için kolşisin dozu: Yaşa göre*: Düşük 0 puan Uygun 1 puan Yüksek 2 puan		
Toplam puan hesaplanır; 3-5 puan hafif , 6-8 puan orta , 9 puan ve üzeri ciddi hastalık olarak sınıflandırılır. *Yaşa göre uygun dozlar: 5 yaş altı için 0.5 mg/gün, 5-10 yaş için 1 mg/gün, 10 yaş üzeri için 1,5mg/gün olarak değerlendirilecektir.		

2.9. Ayırıcı Tanı

2.9.1. Tekrarlayan Ateş

Hastalığın en tipik bulgularından biridir. Ateş 12 saat ile 3 gün arasında sürer (74,75). Hafif ateşten 40°C'ye kadar çıkan ateş olabilir. Sıklıkla diğer klinik bulgularla birlikte. Bazen sadece ateşle seyreden nadir ataklar olabilir. Bazı hastalarda ateş çok yükselmediği için gözden kaçabilir. Aynı hastanın bazı ataklarında yüksek değerler, bazı ataklarında normal değerler ölçülebilir. Eklem ataklarında ateş görülmeyebilir. Kolşisin kullanan hastalarda ateş ve akut faz reaktant yükselmesi ataklara eşlik etmeyebilir (23,64,76-79).

2.9.2. Karın Ağrısı

Karın ağrısı AAA hastalarında en sık görülen ikinci semptomdur ve hastaların yaklaşık %90-95'inde görülür (80-82). Herhangi bir prodromal belirti veya semptom olmadan aniden başlar. Karın ağrısı bir kadranda lokalize olabilir veya karın boyunca yaygın olabilir. Bulgular hafif abdominal distansiyondan şiddetli peritonite kadar geniş bir klinik spektruma sahiptir. Fizik muayenede abdominal distansiyon, rebound duyarlılığı ve barsak seslerinde azalma saptanır. Genellikle 12-24 saat sonra karın ağrısının şiddeti azalır ve atak 2-3 gün içinde tamamen geçer (83). Karın ağrısı ile başvuran hastaların ayırıcı tanısında birçok hastalık olmasına rağmen AAA hastalarının şikayetleri 20 yaşından önce başladığı için hastayı ilk değerlendiren doktorlar genellikle akut apandisit düşünürler. Ancak apendektomi sonrası ateş ve ağrının kendiliğinden gerilemesi veya tekrarlaması başka tanılara yol açar. Daha önce birçok ağrı olmasına rağmen teşhis zor olabilir. Çünkü birçok hastalık tekrarlayan karın ağrısı ve ateş (porfiri gibi) ile ilerleyebilir (62,84,85). Bazı klinisyenler, acil ameliyat ihtiyacını ve yanlış tanı riskini önleyebileceği için elektif apendektomi önermektedir (25).

2.9.3. Artrit/artralji

Çocuklarda AAA atağının en sık görülen üçüncü belirtisi eklem ağrısıdır. Tek bir büyük eklemi içeren eroziv olmayan bir artrit genellikle alt ekstremitede görülür. Bazı durumlarda üst ekstremitede de etkilenebilir. Ayrıca çocukluk çağında birden fazla eklem simetrik veya asimetrik tutulumu da karşılaşılabilecek bir durumdur (86). Ataklar kendini iki farklı şekilde gösterir; Vakaların çoğunluğunu oluşturan kısa süreli akut veya subakut form ve vakaların %5'ini oluşturan kronik form. Akut zamanı eklem tutulumu daha sıktır ve 3 karakteristik özelliği vardır. İlk 24 saatte bu artrit genellikle çok yüksek ateş eşlik eder. Genellikle ayak bileği, diz ve kalça gibi alt ekstremitenin büyük eklemlerinden birini etkiler. Bulgular ve şikayetler genellikle 24-48 saat içinde zirveye ulaşır ve daha sonra hızla düşer ve iz bırakmaz (83,86-88).

2.9.4. Göğüs ağrısı

AAA atağının ortak bulgularından biri göğüs ağrısıdır. %30'luk bir insidans ile AAA'de dördüncü en yaygın olanıdır. Bu ağrı çoğunlukla plevral bazen de perikardiyal tutulumla ilgili olarak ortaya çıkabilir. Genellikle tek taraflı tutulum vardır ve hasta yan ağrısı, nefes alırken batma hissi gibi şikayetlerle başvurur (21). Göğüs röntgeninde

nadiren plevral efüzyon saptanabilir. Efüzyon nedeniyle kostofrenik sinüste küntleşme, aynı tarafta solunum seslerinde azalma ve nadiren atelettazi bildirilmiştir (31,90).

Hastaların %5'inde plevral atak ilk bulgu olabilir. AAA perikardit, hastalığın geç evrelerinde ortaya çıkma eğilimindedir (31,80). Tek başına veya karın ve eklem atakları ile görülebilir (91). AAA'lı hastaların %1,4'ünde perikardit gelişir. AAA'nın tek belirtisi olarak tekrarlayan perikardit olması çok nadirdir. Perikardiyal ataklar nadiren perikardiyal tamponad ve yapıcı perikardite yol açabilir (92).

2.9.5. Cilt Lezyonları

AAA hastalarında en karakteristik bulgu erizipel benzeri eritemdir. AAA hastalarının %3-46'sında, genellikle ayak bileği ve diz arasında, bazen de ayak dorsalinde eritema nodozumun da sıklıkla görüldüğü erizipel benzeri döküntü AAA için oldukça tipiktir (93). Tek taraflı, yaklaşık 10-15 cm çapında, ciltten hafif kabarık, eritem şeklinde pembe-mor renkli döküntülerdir. Lezyonun bulunduğu cilt bölgesi ödemli ve ısı artışı vardır (12,44,94).

Tekrarlayan oral aftlar, ödem, purpura, eritema nodozum ve psoriasis AAA'da görülebilen diğer mukokutanöz lezyonlardır. Anjiyonörotik ödem benzeri kendini sınırlayan lezyonlar %16'sını oluşturur. Erizipel ile ilişkili olan M694V homozigot geninin diğer cilt bulguları ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir (95-97).

2.9.6. Myalji

Türk AAA hastalarında miyalji sıklığının %11,5 ile %39,6 arasında değiştiği bildirilmiştir (98). Miyalji genellikle artrit ile ilişkilidir ve ağır şiddetli olmamasına rağmen genellikle uzun süreli ayakta durma ve ağır egzersizden kaynaklanır (99). Langevitz'in 1994 yılında AAA'lı hastalar üzerinde yaptığı bir çalışmada 'uzamış ateşli miyalji sendromu' tanımlanmıştır. Bu hastalık zamanı belirgin güç kaybının eşlik ettiği miyalji, uzun süre 38.5°C'ye kadar çıkabilen ateş, periton irritasyonu olmayan karın ağrısı, belirgin olarak arttığı görülebilen eritrosit sedimantasyon hızı, lökositoz ve hiperglobulinemi eşlik eder. Nadir de olsa ishal ve purpura görülebilir. 6-8 haftaya kadar uzaya bilir (99-102). M694V mutasyonunun varlığında karın ağrısı, artrit veya ishalin eşlik ettiği uzun süreli ateşli miyaljiler görülebilir. Steroidlere ihtiyaç duyulabilir (103).

2.9.7. Vaskülit

AAA seyri sırasında vaskülit normal popülasyona göre daha sık görülmekte olup, erişkinlerde %2,7-7 oranında Henoch Schönlein Purpura (HSP) ve %0,9-1 oranında Poliarteritis Nodosa (PAN) görüldüğü bildirilmiştir (104,105). AAA hastaları oluşum mekanizması tam olarak gösterilememiştir ve vaskülit gelişen hastaların yarısında kompleman tüketimi, artmış immünoglobulinler ve dolaşımdaki immün kompleksler gösterilmiştir (65). Çocukluk ve ergenlik döneminde ortaya çıkan PAN'da AAA hastalarında mutlaka sorgulanmalıdır (106). Çoğu hastada AAA tanısı vaskülit geliştikten sonra konmaktadır (51). Bu hastalar, kompleman aktivasyonunun bozulmuş inhibisyonu nedeniyle akut vasküler hasara ve siklosporin A toksisitesine daha duyarlıdır. Bu hastalarda PAN vaskülit daha ağır seyreder (107). Ayrıca HSP ve Behçet'li hastalarda MEFV mutasyon sıklığının yüksek olduğunu gösteren veriler mevcuttur (108). AAA hastalarında HSP'nin daha erken yaşlarda ortaya çıktığı, daha fazla ödemin eşlik ettiği ve inflamasyon belirteçlerini daha fazla artırdığı gözlenmiştir (109). Ayrıca hastalığa eşlik eden bir diğer vaskülit tablosu da uzamış ateşli miyalji sendromudur. Yüksek sedimantasyon ve kortikosteroidlere tepkisi ile işaretlenir. Uzamış ateşli miyaljide eklem bulguları çoğunlukla yoktur ve elektromiyografik incelemeler, kas enzim düzeyleri ve kas biyopsisi normal sınırlar içinde bulunur. Önemli laboratuvar bulgularından biri hipergamaglobulinemidir (99,110).

2.9.8. Hepatomegali ve Splenomegali

Yapılan çalışmalarda AAA olan hastalarda %30-40 oranında splenomegali, %3 sıklıkta hepatomegali saptanmıştır (46). Kolşisin kullanan hastalarda tekrarlayan hiperbilirubinemi ve akut hepatit vakaları bildirilmiştir (111). Amiloidozlu hastalarda karaciğer biyopsisi yapılması önerilmez, sistemik amiloidozlu hastalarda ise büyümüş karaciğerden kanama riski nedeniyle yapılmamalıdır (110).

2.9.9. Diğer Klinik Tutulumlar

Nadir de olsa AAA atakları sırasında nörolojik tutulum olabilir. En sık görülen bulgu baş ağrısıdır. AAA hastalığında baş ağrısından sonra en sık görülen kranial tutulum şeklinin serebrovasküler hastalıklar ve demiyelinizan lezyonlar olduğu gösterilmiştir. Kolşisine duyarlı psödotümör serebri ve kranial sinir tutulumu olan olgular da bildirilmiştir (112-114). Nadiren tekrarlayan aseptik menenjit vakaları vardır (115).

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları AAA hastalarında 8-14 kat daha sık görülür ve daha agresif seyrederek (116). Orşit çocuklarda ve ergenlik öncesi erkeklerde görülebilir ve hatta AAA'nın ilk belirtisi olabilir (117). AAA seyrinde gebelik sırasında infertilite ve fetal kayıp meydana gelebilir (118).

2.9.10. Amiloidoz

Amiloidoz hastalığın prognozu için en önemli faktördür. Serum amiloid A adı verilen bu protein karaciğer tarafından sentezlenir. Serum amiloid A'nın malignite, enfeksiyon, AAA atağı, doku hasarı ve diğer inflamatuvar olaylar sonucunda akut faz reaktanlarının parçalanması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (78,119,120). Amiloidoz, proteinüri ile başlayan ve yaklaşık 10 yıl içinde son dönem böbrek yetmezliğine kadar ilerleyen klinik bir tablodur. Tedavi edilmeyen olgularda 40 yaşından önce kronik böbrek yetmezliği geliştiği bilinmektedir (121). Kronik Akdeniz ateşine sekonder gelişen amiloidoz sıklığı farklı ülkelerde farklı oranlarda görülmektedir. Ülkemizde kolşisin kullanmayanlarda %20-25 oranında amiloidoz görüldüğü bildirilmektedir. Düzenli kolşisin kullanımında amiloidoza rastlanmaz (36,122). Türkiyede yapılan bir çalışmada amiloid gelişen AAA hastalarının %50'sinde homozigot M694V mutasyonu olduğu, amiloid gelişmeyen AAA hastalarında bu oranın %36'ya düştüğü görülmüştür. Aynı çalışmada amiloid gelişen AAA hastalarının %74'ünde SAA1 geninde α/α polimorfizmi bulunurken, amiloid gelişmeyen AAA hastalarında bu oran %21'e düştüğü için bir risk faktörü olduğu ortaya çıktı (123). Amiloid tanısı, ilgili organın biyopsisinde amiloid birikiminin gösterilmesiyle konur. En sık böbrek ve rektal biyopsi kullanılır (124). AAA hastalarında kalıcı proteinürisi olan hastalarda ve diyaliz tedavisi veya böbrek nakli gerektiren son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda kolşisin tedavisine en az 2 mg/gün devam edilmelidir (65). Amiloidoz, gastrointestinal sistemde tutulum göstererek kalıcı diyare ile karakterize malabsorpsiyona neden olur. Karaciğer ve dalak sıklıkla tutularak hepatosplenomegali'ye neden olur (125).

2.10. Laboratuvar bulguları

AAA için tanısal laboratuvar testi yoktur. Akut ataklar sırasında rutin kan testi sonuçları spesifik değildir. Atak sırasında lökositoz, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), CRP, fibrinojen, haptoglobulin, kompleman 3 (C3), kompleman 4 (C4) ve SAA gibi akut faz reaktanları yüksek bulunur. Tüm bu bulguların normal olduğu veya akut ataklar

arasındaki dönemde belirgin bir azalma gösterdiği bildirilse de son zamanlarda SAA'nın subklinik inflamasyonu saptamada en iyi gösterge olduğu sonucuna varılmıştır (78,126,127). Hemen hemen tüm ataklarda C-reaktif protein artar, atakların %90'ında sedimantasyon, %60'ında fibrinojen ve atakların %50'sinde lökosit sayısı artar. Ataklarda trombosit ve ferritin artışının görülmediğini bildiren yayınlar olmakla birlikte (124,127), aksini bildiren yayınlar da mevcuttur (128). Tümör nekroz faktörü (TNF), IL-1, IL-6, IL-8 seviyeleri de önemli ölçüde arttığı, ancak interferon (IFN) aktivitesinde azalma rapor edilmiş (129). Amiloidozun en erken belirtileri mikroalbüminüri ve proteinüridir. AAA seyrinde atak sonrası dışkıda mikroskopik hematüri ve gizli kan saptanabilir (83,130).

2.11.Tedavi

AAA genel olarak iyi bir tedavi yaklaşımı ile kolaylıkla kontrol altına alınabilen bir hastalıktır. Ayrıca klinisyenlerin farklı tedavi yaklaşımları, farklı coğrafi bölgelerden olmaları ve farklı sağlık kaynaklarına sahip olmaları da klinik başarıyı etkilemektedir (131). AAA tedavisinde temel amaç inflamasyonu azaltmak, olası atakları önlemek ve sekonder amiloidoz gelişimini engellemektir. Kolşisin tedavide ilk kez 1972 yılında Emir Özkan ve Goldfinger tarafından yapılan bir çalışmada kullanılmıştır. Bu döneme kadar çeşitli tedaviler kullanılsa da bu tarihten itibaren hastalığın tek tedavi ajanı olarak; Colchicum Autumnale (sonbahar çiğdem) adlı bitkiden elde edilen bir trisiklik alkaloid ajan olan Kolşisin kullanıldı (132-135). Kolşisin yağda çözünürlüğü yüksek bir ilaç olduğu için vücuda alındıktan sonra dokulara hızla geçer. Plazma konsantrasyonu, oral uygulamadan 2 saat sonra doruğa ulaşır. Serum yarı ömrü yaklaşık 20 saattir. Karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilir (136-138). Çoğunlukla safra ve feçesle, %10-20 böbrekler yoluyla atılır (139).

Kolşisin kullanan hastalarda hem atak şiddetinde hem de atak sıklığında anlamlı azalma vardır. Hastaların %50'sinde ataklar neredeyse tamamen kaybolurken %30-40'ında kısmen kaybolur. Hastaların %5-10'unda ataklar kontrol altına alınamasa da maksimum dozu verdiğimizde bile yanıt alınamıyor. Kolşisinin büyüme üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi gösterilmemiştir (72,140,141). Ataklar kontrol altına alınamasa bile amiloidoz gelişme riskini azaltmak için kolşisin tedavisine devam edilmelidir. Yaşam boyu kolşisin kullanımı önerilir ve ilaç kesildiğinde ataklar tekrarlar (134,142-144).

Amiloidoz gelişimini önlemek için kullanılacak en düşük kolşisin dozu 1 mg'dır. En düşük kullanım günlük 1 mg, en yüksek kullanım 2 mg'dır. 5 yaşın altındaki çocuklar için kolşisin başlangıç dozu $\leq 0,5$ mg/gün, yaşa göre ortalama; 5-10 yaş arası çocuklarda 0,5-1 mg/gün, 10 yaş üzeri çocuklarda 1-1,5 mg/gündür. Pediatrik yaş grubunda vücut ağırlığına göre en etkili doz 0,02-0,03 mg/kg/gün'dür (21,145-147). Standart doz tedaviye yanıt vermeyen hastalarda doz 0,25 mg artırılarak maksimum 2 mg'a kadar çıkılabilir (145,148).

Kolşisin intoksikasyonuna neden olabilecek durumlar:

- Günlük alınması gereken maksimum dozun (çocuklarda 2 mg/gün, yetişkinlerde 3 mg/gün) aşılması,
- Karaciğer veya böbrek yetmezliği (ilacın yarılanma ömrü 9-16 saat, ancak yarısı -Sirotik hastalarda yaşam süresi 7 kat uzayabilir),
- Makrolidler, ketokonazol, ritonavir, verapamil, sitatinler ve sitokrom 3A4 yoluyla metabolize edilen diğer ilaçların birlikte uygulanması (135). Kolşisin, sitokrom 3A4'ü zayıf bir şekilde inhibe eden azitromisin ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Kolşisin intoksikasyonu doza bağlıdır. 7 mg'ın üzerinde ölümcüldür (149). Mide bulantısı, ishal ve karın ağrısı oluşur. Zehirlenmenin ilk aşamasında dehidratasyon, şok, akut böbrek ve karaciğer yetmezliği ve nöbetler vardır. İkinci aşamada ilacı aldıktan 24-72 saat sonra ortaya çıkan çoklu organ yetmezlikleri vardır (150-153).

Kolşisine dirençli olguları tanımlamak için tedavi yanıtını gösteren AAA50 kriterleri belirlendi. Bu kriterler; (i) tedavi ile atak sıklığındaki yüzde değişim, (ii) tedavi ile atak süresindeki yüzde değişim, (iii) hastanın global hastalık değerlendirme ölçeği, (iv) hekimin global hastalık değerlendirme ölçeği, (v) tedaviye bağlı artrit atak yüzdesi, (vi) tedavi ile CRP, ESR veya SAA düzeylerinde yüzde değişim". Tedaviye yanıt vermiş denilebilmesi için son 3-6 ayda 6 kriterden 5'inde kötüleşme olmaksızın %50 düzelme olması gerekir (154). Tüm ateşli atakları engelleyemediği, ancak kalıcı glomerüler hasarı olmayan hastalarda proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir. Pürin, AAA hastalarının serumunda kaspaz-1 aktivitesini düzenleyemediği için TNF, interlökin (IL)-1, IL-6 ve IL-8 seviyeleri yüksektir. IL-1, özellikle AAA hastalarındaki inflamatuvar süreçten sorumludur. Bu nedenle tedavide IL-1 antagonist ilaçlar da kullanılmaktadır. AAA hastalarının %5-10'unu oluşturan kolşisin tedavisine dirençli hastalarda özellikle tercih

edilirler. Ancak SAA düzeyi yüksek ve kolşisine bağlı ciddi yan etkileri olan hastalarda da tercih edilirler (154-156). Üç farklı IL-1 antagonisti vardır:

- Anakinra; Bir insan rekombinant IL-1 reseptör antagonistidir. Önerilen tedavi dozu çocuklarda 1 mg/kg/gün ve yetişkinlerde 100 mg/gün'dür.
- Riloncept; füzyon proteini. IL-1 reseptörünün hücre dışı kısmını ve IL-1 reseptörü aksesuar proteinini içerir. Dolaşımdaki IL-1'i etkisiz hale getirir (157).
- Kanakinumab; IgG1 tipi IL-1 monoklonal antikorudur. Önerilen tedavi dozu, <40 kg çocuklar için 2 mg/kg/8 hafta ve yetişkinler için 150 mg/8 haftadır. Anakinra ve kanakinumab güvenli ilaçlardır (158,159).

2.12. MikroRNA (miRNA)

miRNA'lar; Genomda protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden ve protein kodlayan ekzon veya intron bölgelerinden transkripsiyonu yapılan ancak proteine çevrilmeyen fonksiyonel RNA molekülleridir (160,161). miRNA'ların %95'i 18-24 nükleotit (nt) uzunluğunda ve ortalama 22 nükleotit uzunluğundadır (162,163). İnsanlarda yaklaşık 706 miRNA'lar tanımlanmıştır ve genomun %30'unu kontrol etmektedir. Ayrıca miRBase veri tabanında farklı organizmalara ait, yani her biri farklı bir genomik organizasyona ve farklı bir biyogenetik mekanizmaya sahip 5000'den fazla miRNA'lar girişi yapılmıştır (164). miRNA'ların isimlendirilmesinde ilgili türün kısaltmasının önüne "miR" ön eki gelir ve sayısal kodlaması "mir" ön ekinden sonra verilir. Büyük harfle yazılmayan "mir", miRNA öncesi durumu temsil eder ve büyük harfle yazılan "miR", olgun miRNA'ların durumunu temsil eder. İsimlendirme, yaklaşık olarak aynı dizilere sahip miRNA'ları adlandırmak için kullanılır. Örneğin, miRNA-133 ve miRNA-133b dizisi benzer olduğu için a ve b soneklere kullanılır. Üç harfli önek, türün kökenine bağlı olarak hsa-miR-208 (hsa: Homo sapiens) olarak adlandırılır. İki olgun miRNA, aynı pre-miRNA'ların zıt dizilerinden kaynaklanıyorsa, ilgili dizinin sonuna bağlı olarak -3p veya -5p sonekini alırlar.(165-167).

2.12.1. miRNA'ların Yapısı ve Keşfi

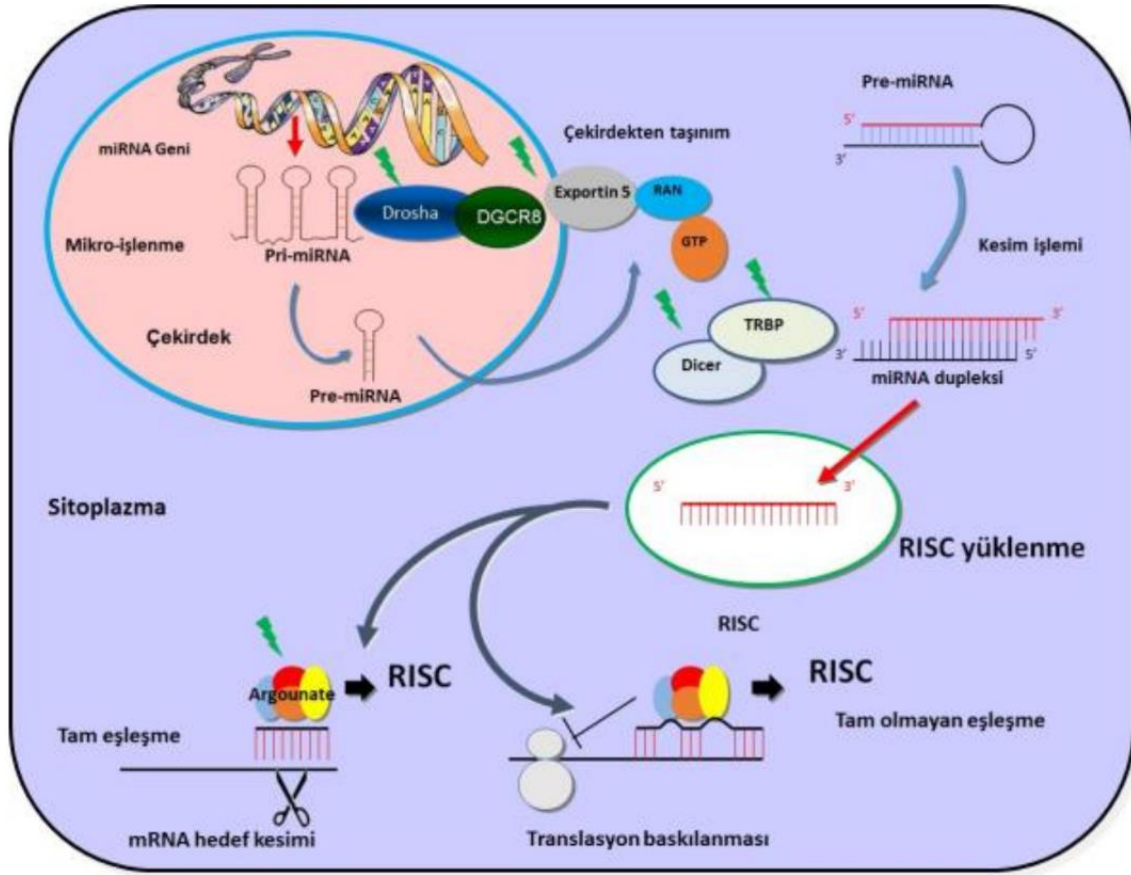
İnsan genomunun yaklaşık %1-2'si fonksiyonel proteinleri sentezlemek için

kullanılır. Uzun yıllar boyunca genomun geri kalanının çok az önemli olduğu düşünülüyordu. Bu görüş, küçük kodlamayan RNA'ların keşfinden sonra değişti (168,169). İlk miRNA'lar, Lee ve arkadaşları tarafından keşfedildi (163). İlk miRNA, nematod grubundan bir solucan olan *Caenorhabditis elegans* üzerinde yapılan bir genetik çalışma sırasında 1993 yılında Victor Ambros Laboratuvarı'nda bulundu ve bu 2001 yılında miRNA'lar lin-4 adı verildi (170,171). O zamanlar bu yeni RNA tipinin nematod spesifik bir RNA olduğu düşünüldü ve üzerinde durulmadı. Ancak daha sonraki çalışmalarda miRNA'ların sadece nematodlarda değil, insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve virüslerde de bulunduğu ve gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (172). Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda miRBase 20 veri tabanında kayıtlı 1872 öncü insan miRNA'lar dizisi tespit edilmiştir. Tanımlanan bu miRNA'ların en çok 1. Kromozomda (161), en az ise Y kromozomunda yer aldığı gösterilmiştir. Araştırmacılar, insan miRNA'larının %50'sinden fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde ve kırılma noktalarına yakın bölgelerde lokalize olduğunu bulmuşlardır (173).

2.12.2. miRNA'ların Biyogenezi

miRNA'ların biyolojik oluşum süreci, hücre çekirdeğinde başlayıp sitoplazmada son bulan bir dizi süreç sonucunda gerçekleşir (174). miRNA'lar üç ardışık işlemden sonra oluşturulur. Birinci süreçte miRNA'lar genlerinden birincil miRNA A'nın (pri-miRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci işlemde, pri-miRNA'lar çekirdekte öncü miRNA'lar (pre-miRNA'lar) dönüştürülür. Üçüncü süreçte sitoplazmada olgun miRNA'lar oluşur (175-180). miRNA'ların oluşumu, çekirdekteki genomik DNA üzerindeki ilgili genlerden birincil miRNA'nın (pri-miRNA'lar) transkripsiyonu ile başlar. 500 ila 3000 baz çifti ile pri-miRNA'lar bir "saç tokası; "Kapak" ve "Poly A" uzantılarıyla "firkete" adı verilen bir yapıdan oluşur (169,181-186). Pri-miRNA'lar, RNAase II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Çekirdekteki bu yapı, RNAase III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Droscha ve onun kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından parçalanır ve yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA'ya dönüştürülür. Bu molekül, nükleer taşıma reseptörü Exportin 5 ve nükleer protein RAN-GTP'ye bağlı olarak sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAase III enzim ailesinden Dicer adlı bir nükleaz tarafından parçalanır ve 18-24 nükleotid uzunluğunda çift sarmallı miRNA: miRNA dupleksine dönüştürülür ve ayrıca RNA kaynaklı susturma

kompleksinin (RISC) yapısının oluşumunu başlatır (187-196).



Şekil 2.12.2.1: miRNA'ların biyogenezi

RISC: RNA kaynaklı susturma kompleksi; **DGCR8:** Mikro-işlemci kompleksi alt birimi; **RAN:** Ras ilişkili nükleer protein; **GTP:** Guanozin trifosfat; **TRBP:** Transaktivasyon yanıt elemanı RNA bağlayıcı protein; **Dicer:** Çift sarmallı RNA'ya özgü endoribonükleaz

Pre-miRNA'lar, nükleer taşıma reseptörü Exportin 5 ve nükleer protein RAN-GTP'ye bağlı olarak çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada pre-miRNA'lar, RNAase III enzim ailesinden bir endonükleaz olan Dicer ve 18'de Transaktivasyon Duyarlı Bölge (TAR) transaktivatör RNA bağlayıcı protein (TRBP) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aktive edici protein (PACT) ile etkileşime girer. 24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA (miRNA duplex) çevrilir (**Şekil 2.12.2.1**) (197-201).

RISC tam bileşimi belirsizdir, ancak insanlarda dört aile üyesi tanımlanmış olan Argonaute (Ago1-4) proteinleri, onun temel bileşenleridir. Ortaya çıkan RISC kompleks,

yoluyla hedef miRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak protein sentezini kısmen veya tamamen inhibe edebilir (202-206).

2.12.3. miRNA'ların Fonksiyonu

miRNA'ların bir hücrede üretilen toplam proteinlerin yaklaşık %30'unu düzenlediği düşünülmektedir. Böylece miRNA'lar hücre proliferasyonu, gelişimi, apoptoz, hematopoitik hücre gelişiminin düzenlenmesi, yaşlanma ve metabolizma gibi biyolojik olaylarda yer alır (172,207,208). Şimdiye kadar keşfedilen miRNA'ların sadece küçük bir bölümünün biyolojik rolleri aydınlatılmıştır. Olgun miRNA'lar, hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılır. miRNA; RISC ile bir kompleks oluşturur, baz eşleşmesi ile miRNA'ya bağlanır ve daha sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya miRNA'nın bozulmasına neden olur (209-211). Çalışmalar, tespit edilen insan miRNA'larının %50'sinin genomda kırılğan bölgeler olarak bilinen alanlarda bulunduğunu ve kanserle ilişkili olduğunu göstermiştir (173). Ek olarak, organların ve organ sistemlerinin gelişiminde önemli bir olay olan embriyonik kök hücre farklılaşmasının, miRNA'lar tarafından önemli ölçüde modüle edildiği bulunmuştur (212-214).

2.12.4. miRNA ve AAA

Birçok araştırmacı, AAA hastalığı ile ilişkili olabilecek miRNA'ları tanımlamıştır. 2017 çalışmasına göre, AAA hastaları MEFV mutasyonlarına göre alt bölümlere ayrıldı; bu gruplar ekzon 10 mutasyonu olan AAA hastaları (grup A), ekzon 3 mutasyonu olan AAA hastaları (grup B) ve her iki ekzonda mutasyonu olmayan AAA hastaları (grup C) olarak tanımlandı. Mikroarray analizinden sonra A ve B grupları arasında 24 farklı miRNA, A ve C grupları arasında 30 farklı miRNA, B ve C grupları arasında 25 farklı miRNA ekspresyon farkı tespit edildi. Bu bulgular gelecekte AAA'nin alt gruplarının belirlenmesinde faydalı olabilecek biyobelirteç çalışmalarına yol açabilir (215). Yakın tarihli bir başka çalışmada, miRNA'ların AAA patogenezindeki etkisini araştırmak için 51 hasta ve 49 sağlıklı kontrol ile miRNA 28 analizi yapıldı. Literatürden seçilen 15 miRNA için qRT-PCR ile ekspresyon analizi yapıldı. Sonuç olarak; miR-125a, miR-132, miR-146a, miR-155, miR15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR-223, miR-26a ve miR-34a hastada anlamlı olarak azalmıştı. Hastalardan oluşan çalışma grubu kendi içinde

karşılaştırıldığında kolşisin alan hasta grubunda miR-132, miR-15a, miR-181a, miR23b ve miR-26a'nın arttığı; miR-146a, miR-15a, miR-16, miR-26a ve miR-34a'nın azaldığı belirlendi. Atak geçiren hastalarda MiR-132, miR-15a, miR-21 ve miR-34a ekspresyonları anlamlı olarak azaldı (216,217). Başka bir çalışmada 6 AAA hastası ve 6 kontrol bireyi ile mikroarray ve biyoinformatik çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak hastalarda miR-20a-5p ekspresyonunun arttığı, hastalarda miR-197-3p ekspresyonunun azaldığı görüldü (218).

2.12.5. miR-204-3p

Literatürde farklı kanser türlerinde plazma ve doku miR-204 düzeylerindeki değişiklikler ile ilgili çalışmalar bulunmakta ve bu araştırmaların sonuçları miR-204'ün bu kanserlerin patogenezi ile ilişkili olduğunu kuvvetle desteklemektedir (219,220). Ancak inflamatuvar hastalıklar ile miRNA-204 arasındaki ilişkiyi inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Crohn hastalığı olan hastalarda yapılan bir çalışmada, etkilenen bağırsak mukozasında miR-204 ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur (221). Bunun tersine, Lai ve ark. Romatoid artrit hastalarda plazma miR-204 düzeylerinin daha düşük olduğunu ve anti-TNF-alfa tedavisinden sonra arttığını bulmuşlardır (222,223).

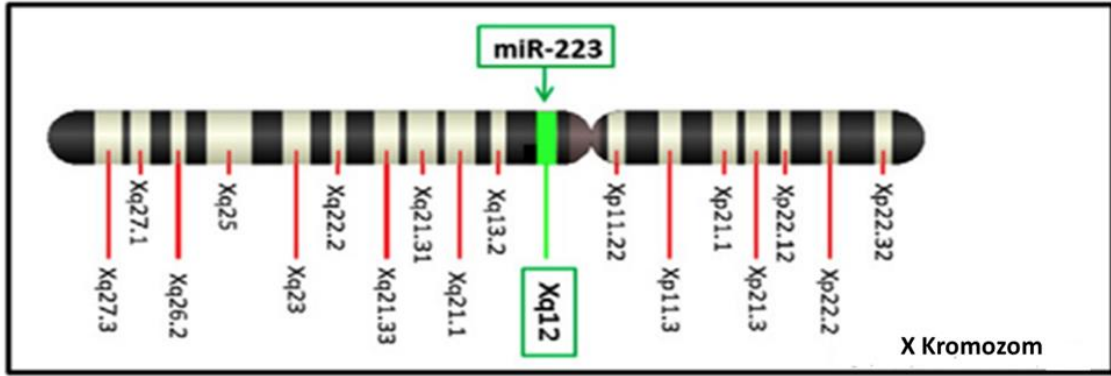
miR-204, inflamatuvar sitokin üretimini baskıladığı ve bu nedenle AAA'li hastalar için yararlı bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, AAA hastalarının remisyon döneminde plazma miR-204 seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını bulmuşlar. Plazma miR-204 düzeylerinde en belirgin düşüş M694V (+) hastalarda görülmüş (223).

Yayınlanmış başka bir çalışmada, atakları olan ve olmayan hastalardan alınan serum örnekleri kullanılarak mikroarray analizi yapılmış ve ataklı AAA hastalarında miR-204-3p ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Makrofajlarda (THP-1 hücre hattı) miR-204-3p ekspresyonu lipopolisakkarit (LPS) indüksiyonu ile baskılandı ve Toll benzeri reseptör 4 (TLR) tarafından aktive edilen sitokinlerin üretimi indüklenerek niceleme çalışmaları yapıldı. Biyoinformatik ve lusiferaz aktivite deneylerinin sonuçlarına göre miR-204-3p'nin fosfoinosit 3-kinaz gama (PI3K γ) sinyal yolunda etkili bir miRNA olduğu ortaya çıktı. Sonuç olarak serumda bulunan miR-204-3p'nin AAA'de potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi ve PI3K γ yolu aracılığıyla sitokin üretimini baskılayabilen bir molekül olması nedeniyle tedavi hedefi olabileceği

belirtilmiştir (224).

2.12.6. miR-223-3p

miR-223 ilk olarak hematoloji çalışmaları sırasında keşfedildi. miR-223'ün en önemli rolü, hematopoietik hücrelerin farklılaşmasını düzenlemektir. Kemik iliğinde ekspresyonları yüksektir. Hematopoietik kök hücreler, kemik iliği, beyaz kan hücreleri ve lenfosit hücrelerinin gelişimini etkiler (225). miRNA, 223 X kromozomunun q12 kolunda bulunan (*Şekil 2.12.6.1*) bir miRNA 'dır ve insanlarda 22 nükleotit uzunluğundadır. İlk çalışmalarda miR-223'ün miyeloid hücrelerle sınırlı olduğu bildirilmiş olsa da (226), fonksiyonel miR-223 ekspresyonunun hepatositler dahil miyeloid olmayan hücre tiplerinde de meydana geldiği birçok grup tarafından gösterilmiştir (227).



Şekil 2.12.6.1. miR-223'ün kromozomal lokasyonu

Hepatik miR-223 seviyeleri, iskemik/reperfüzyon hasarında (119) önemli ölçüde arttığı ve hepatosellüler karsinomda azaldığı gözlenmiştir (228). Kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde yer alan miRNA'ların sayısının artmasıyla birlikte, çalışmalar miR-223'ün karmaşık kolesterol metabolizması için çok yönlü bir merkezi düzenleyici olduğunu göstermiştir (229,230).

miR-223'ün bağışıklık sisteminin homeostazında ve gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmektedir. miR-223'ün birçok kanser türü, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar ve diğer patolojik süreçlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (230).

miR-223'ün nötrofillerde NLRP3'ün düzenlenmesinde önemli rollere sahip olduğu düşünülmektedir. IL-6 tarafından miR 223'ün down regülasyonunun IL-1 β ve IL-6

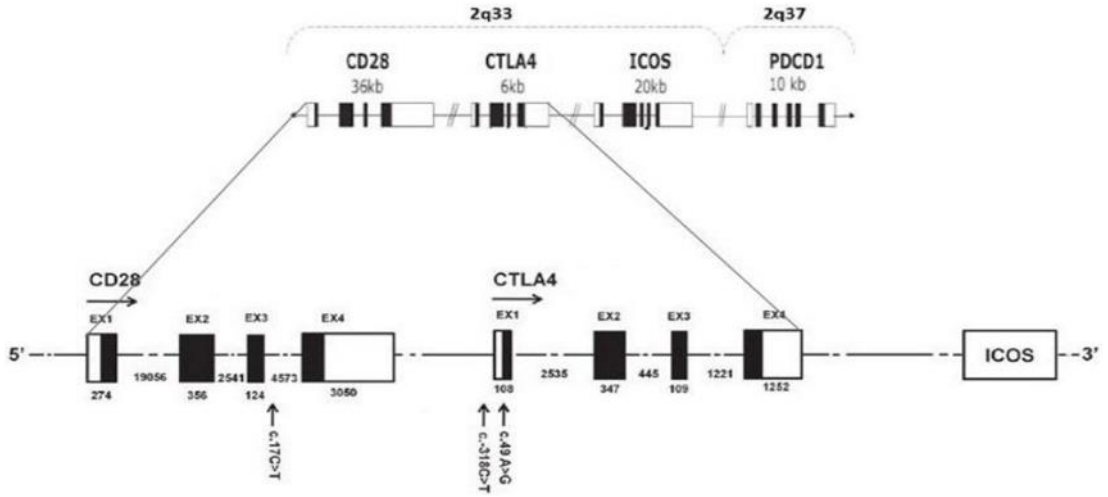
üretimini desteklediği bildirilmiştir. Serum miR-223 düzeylerinin AAA hastalarında anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (217). Ancak sonuçlar tartışmalıdır. RA'li hastaların periferik T hücrelerinde ve sinovyumunda miR-223'ün ekspresyonu arttığı bildirilmiştir (230).

2.13. Deltex1 (DTX1)

Substrat tanımının özgüllüğü, ubiquitinasyon sırasında ubiquitin E3 ligaz tarafından belirlenir. Ubiquitin E3 ligazları olarak işlev gören insan DTX protein ailesi, DTX1, DTX2, DTX3, DTX3L ve DTX4 olmak üzere beş üyeden oluşur. DTX1, prolin bakımından zengin bir motif içeren bir ubiquitin E3 ligaz'dır. DTX1'in, E3 ligaza bağımlı ve bağımsız mekanizmalar tarafından T hücresi aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir. Farelerde DTX1 delesyonunun, T hücrelerinin ve lupus benzeri otoimmün sendromların hiperaktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Ancak insan otoimmün hastalıkları ile ilişkisi kesin olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda T hücre fonksiyonunun negatif regülatörü olabileceği önerilmektedir. Bu etkisini IFN- γ üretimini arttırarak gösterdiği öne sürülmektedir (231).

2.14. Sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili antijen geni-4 (CTLA-4)

CTLA-4, aktivasyondan 24-48 saat sonra düzenleyici T hücrelerinde (Treg) ve T hücrelerinin yüzeyinde geçici olarak eksprese edilen bir tip I transmembran proteindir. CTLA-4 yolu, T hücrelerinin aktivasyonunu engelleyebilen inhibitör moleküllerden biridir ve otoimmün patolojilerin önlenmesinde hayati rolü olan en önemli yollardan biridir (232). CTLA-4 molekülünü kodlayan gen 2. kromozomun uzun kolundadır; 2q33 bandında yer alır ve 3 adet ekzondan oluşan polimorfik bir gen bölgesidir (*Şekil 2.14.1*) (233,234).



Şekil 2.14.1. CTLA4 (2q33) genomik alanları

T hücresi aktivasyonunda kritik bir kontrol noktası olan CTLA4, birçok otoimmün hastalığa neden olmuştur. CTLA-4 molekülü, T hücresi aktivasyonu üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahiptir ve antijen sunan hücrelerde ligand CD80 / 86 (B7.1, B7.2) ile etkileşimleri yoluyla CD28'e bağımlı T hücresi aktivasyonunu bloke ederek immün toleransın korunmasına katkıda bulunur (235). CTLA-4 / B7 kompleksi, CD28 / B7 kompleksi ile rekabet edebilir ve T hücresi gelişimini, sitokin üretimini ve immün reaksiyonları etkileyen T hücreleri üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olabilir (236). CTLA-4 gen polimorfizmlerinin, CTLA-4 proteininin inhibe edici fonksiyonunu etkilediği gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, CTLA-4 gen polimorfizmlerinin, romatoid artrit, sistemik lupuseritematozus, Graves hastalığı, otoimmüntiroid hastalığı ve tip I diyabet gibi çeşitli otoimmün hastalıklara duyarlılık veya şiddet kazandırdığını göstermektedir (237). CTLA-4'ün diğer işlevleri aşağıda özetlenmiştir (*Tablo 2.14.1.1*).

Tablo 2.14.1.1. CTLA-4 molekülünün ana işlevleri

• Sitokin üretimini ve hücre çoğalmasını engeller (238).
• Hücre döngüsü ilerlemesini engeller, nükleer faktör kappa beta (NF- κ B) ve aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) gibi transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonuna yol açar (239).
• Hücre hareketliliğini artırır (240).
• T hücresi-antijen sunucu hücre (APC) temas süresini kısaltır (240).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' nun 20/03/2019 tarihli 83045809-604.01.02 sayılı onayı alınarak gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen tüm olgulara, kan alımı öncesinde çalışmayı anlatan bilgilendirme formu verildi ve imzalı onam belgesi alındı.

Çalışma grupları; Nisan 2019- Nisan 2020 tarihleri arasında, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Romatolojisi Anabilim Dalı'nda AAA düzenli, takipli, 18 yaş altında olan 48 remisyon döneminde ve aynı demografik özelliklere sahip 36 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edildi.

3.1.1. Çalışma Grupları

3.1.1.1. Kontrol Grubu

Çalışmaya dahil edilen hastalarla benzer demografik özelliklere sahip olmayan herhangi bir ek hastalığı ve ilaç kullanımı olmayan, yazılı onam veren yaş ortalaması 10 ± 4 olan 13 kız çocuk, 23 erkek çocuk (Kontrol; n:36) kontrol grubunu oluşturmaktadır.

3.1.1.2. Hasta Grubu

Çalışmaya dahil edilen hastalar AAA hastalığı olan, yazılı onam veren yaş ortalaması 12 ± 4 olan 26 kız çocuk, 22 erkek çocuk (Hasta; n:48) bu gruba dahil olmuştur.

3.2. Çalışmadan Dışlama Kriterleri

Aşağıda belirtilen özelliklere sahip olan olgular çalışmaya alınmamıştır.

- 18 yaş üstü hasta ve kontroller
- Nörolojik hastalık ve ağır psikiyatrik hastalık
- Kronik karaciğer ve böbrek yetmezliği
- Kriterleri doldurmayan hastalar

- Başka bir inflamatuvar hastalığa sahip olanlar
- Bilgilendirilmiş onam vermeyen/çalışmaya katılmak istemeyen hastalar
- Amiloidoz tanısı alan hastalar

3.3. Örneklerin Alınması ve Çalışılan Parametreler

18 yaş altında hasta ve kontrol grubundan kan alındı. Ön koldan 1 adet jelli tüpe ve 1 adet K3 –EDTA (1,6 mg/mL kan) ve proteaz inhibitörü olan aprotinin (50 KIU/mL kan) içeren tüpe (BD, katalog no: 361017) kan alındı. Kanlar alındıktan sonra K3–EDTA ve aprotinin içeren tüp bekletilmeden, jelli tüpde ise pıhtılaşma gerçekleştikten sonra 3500 rpm’ de 10 dk +4°C’ de santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen örneklerinden ayrılan serumlarda mikroRNA izolasyon kiti, plazmada ise DTX1, CTLA-4 ve pyrin düzeylerinin ölçümü için ependorflara porsiyonlanıp analize kadar -80° C’ de saklandı. Belirtilen bu parametrelerin analizi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı’ nda yapıldı. Çalışmaya alınan hastaların İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Fikret Biyal Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı’ nda çalışılan rutin test parametreleri (kan glukoz düzeyleri, tam kan sayımı, karaciğer enzimleri) sonuçları laboratuvar bilgi sisteminden alındı. Çalışma ile ilişkili olarak demografik veriler (hastalık durumu, hastalık başlangıç yaşı, tanı yaşı, kullanılan ilaçlar, mutasyonlar, atak sıklığı, atak süresi, görülen bulgular) bilgileri gönüllülerin dosyalarından temin edildi.

Çalışmaya dahil edilen AAA hastalarının AAA50 skoru, hastaların dosyalarından elde edilen aşağıdaki veriler ile hesaplandı:

- Tedavi ile atak sıklığındaki değişim yüzdesi
- Tedavi ile atak süresindeki değişim yüzdesi
- Hastaların/ebeveynlerin tedavi ile hastalık şiddetinin global değerlendirmesindeki yüzde değişimi
- Hekimlerin tedavi ile hastalık şiddetine ilişkin global değerlendirmesindeki yüzde değişimi
- Tedavi ile artrit ataklarının sıklığındaki değişim yüzdesi
- Tedavi ile akut faz reaktanlarının seviyelerindeki yüzde değişim

3.4. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Mikropipet
- Mikropipet uçları (10, 100 ve 1000 µL)
- Ependorf tüpleri
- Ependorf santrifüj (Hangzhou Allsheng Instruments, Super Mini-14K)
- Soğutmalı santrifüj (Nuve, NF400R)
- Derin dondurucu (Elcold Lab, Haier ULT Freezer)
- Buzdolabı
- Vortex
- Distile su cihazı
- Etüv
- Nanodrop 2000c Spektrofotometre (Thermo Scientific)
- Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR; real time polymerase chain reaction) cihazı (AB Applied Biosystems Step One Plus)
- Otomatik ELİSA cihazı (ELx800, Bio-Tek Instruments, Inc.)
- Otomatik ELİSA yıkayıcı (ELx50 Auto Washer, Bio-Tek Instruments, Inc.)

3.5. Yöntemler

3.5.1. MiR-204-3p ve miR-223-3p Tayini

5 basamaktan oluşmaktadır:

- Total RNA izolasyonu
- RNA miktar ölçümü
- Komplementer DNA (cDNA) sentezi

- Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun (qPCR; quantitative real-time polymerase chain reaction) gerçekleştirilmesi
- $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile analiz

3.5.1.1. Total RNA İzolasyonu

Bu aşamada Extract Me mikroRNA kiti kullanılmıştır (Katalog no: EM12)

- %100 β -merkaptoetanol, miRLys (miRNA Lysis) tamponuna %1'lik olacak şekilde bir nihai konsantrasyonla ilave edildi.
- Kit protokolünde belirtilen oranda miRW (miRNA yıkama) tamponuna %99,9 (mutlak) etanol eklendi.
- Tamponların kapakları buharlaşmayı önlemek için sıkıca kapatılmıştır.
- -80°C ' de dondurulmuş serum çalışmadan 1 gün önce -20°C ' e alındı. Çalışmaya başlamadan oda ısısında (37°C ' de) çözünmesi için beklendi.
- Eppendorflara 200 μL serum pipetlendi. Daha sonra 400 μL miRLys tamponu eklenerek vorteks ile karıştırıldıktan sonra 15000 g'de 120 saniye santrifüj edildi.
- Elde edilen süpernatant, toplama tüpündeki DNA saflaştırma kolonuna aktarıldıktan sonra 120 saniye 15000 g'de santrifüj edildi. Filtreden akan malzeme steril 1.5 mL Eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Bu karışım RNA saflaştırma kolonuna aktarıldıktan sonra 120 saniye 15000 g'de santrifüj edildi. Süzüntü, 1.5 mL steril Eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Filtrata aynı hacimde %99.9 etanol aktarıldıktan sonra vorteks ile karıştırıldı. Bu karışımın 650 μL 'si miRNA saflaştırma kolonuna aktarıldı ve 120 saniye 15000 g'de santrifüjlendi. Elde edilen süzüntü atıldı.
- Kalan karışım aynı miRNA saflaştırma kolonuna aktarıldı ve 15000 g'de 120 saniye santrifüjlendi ve filtreden akan sıvı atıldı.
- miRNA bağlı mini kolonlar hazırlandı.

- Hazırlanan her bir mini kolona 500 µL miRW tamponu eklendi. 15000 g'de 60 saniye santrifüj edildi. Süzüntü atıldıktan sonra 2 kez daha yıkama yapılmıştır.
- Son santrifüjlemeden sonra kalan süzüntü atıldı ve 180 saniye 15000 g'de santrifüjlendi.
- Santrifüjlemeden sonra süzüntü atıldı ve minikolonlar dikkatlice 1.5 mL steril eppendorf tüpe aktarıldı.
- Saflaştırma minikolon membranının merkezine 60 µL elüsyon (miREB) tamponu eklendikten ve 120 saniye oda sıcaklığında bırakıldıktan sonra, mini kolonlar 120 saniye 10000 g'de santrifüjlendi.
- Mini kolonlar çıkarıldıktan sonra 30060 µL içeren eppendorflar bir sonraki aşamaya kadar -80°C'de saklandı.

3.5.1.2. RNA Miktar Ölçümü

RNA izolasyonunun ardından Nanodrop Spektrofotometre ile RNA konsantrasyonu belirlendi. Her numunedeki RNA miktarı, 260 ve 280 nm dalga boylarında optik yoğunluk ölçülerek hesaplandı.

3.5.1.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentez

Bu basamakta Wizscript cDNA Synthesis Kit (High Capacity, Katalog no:W2211) ve Suarge Biyoteknoloji Firması' nın miRNA qPCR SL Assay Kit içeriğindeki RT primeri (Katalog no: SUA-MIREXs) kullanıldı. İç kontrol (housekeeping) olarak U6 (Katalog no:MIREXs-U6) tercih edildi (*Tablo 3.5.1.3.1.*).

Tablo 3.5.1.3.1: hsa_miR-204-3p, hsa_miR-223-3p ve hsa_RNU6-6P kit özellikleri

Gen Adı	Erişim no	Ölçüm Adı ve numarası	Fragment uzunluğu (bp)
hsa_miR-204-3p	MIMAT0022693	miRNA qPCR SL Assay for hsa-miR-204-3p, MIREXs-H204-3	83–87

hsa_miR-223-3p	MIMAT0000280	miRNA qPCR SL Assay for hsa-miR-223-3p, MIREXs-H223-3	83-88
hsa_RNU6-6P	Entrez Gene ID: 26826	miRNA qPCR U6 Control Assay for Human RNU6-6P, MIREXs-U6	89

İlk ters transkripsiyon (RT) master mix hazırlandı. Bu karışım daha sonra RT için RNA'ya eklendi. Son adımda, bir termal döngüleyicide (PCR cihazı/DNA yükselticisi) RT reaksiyonu gerçekleştirildi.

RT ana karışımı (10 µL) hazırlama adımları;

- Kit içeriği çözüldükten sonra nihai hacim 10 µL'dir; 4 µL RNAase içermeyen su, 2 µL reaksiyon tamponu, 1 µL dNTD karışımı, 2 µL RT primer karışımı (1 µL U6 dahili kontrol RT, 0,5 µL miR-204-3p RT ve 0,5 µL miR-223-3p RT), 1 µL WizScript Rtase bozuk.

- Buz üzerinde master mix hazırlandı.

RT reaksiyonu için hazırlık;

- Sentez öncesi, numunelerde yer alan RNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde gerekli hesaplama yapıldı.
- 96 kuyucuklu reaksiyon plate'e toplam hacim 10 µL olacak şekilde RNAaz içermeyen su ve RNA örneği pipetlendi.
- Daha sonra her bir kuyuya 10 µL RT master mix pipetlendikten sonra iyice karıştırmak için iki kez pipetlenip tekrar kuyucuğa bırakıldı.
- Plate üzeri kapatıldı.
- Plaka, alttaki sıvıyı toplamak ve hava kabarcığının çıkması için kısa süre santrifüj edildi.
- Plak RT aşamasına kadar buz üzerinde tutuldu. RT aşaması;
- Reaksiyon plakası, termal döngüleyiciye yüklenir.

- 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika, 85°C'de 5 dakika inkübasyondan sonra 4°C'de tutulmuştur. Tüm bu aşamalardan sonra RT-PCR'de kullanılmak üzere RNA'dan tek sarmallı cDNA sentezlendi.

3.5.1.4. qPCR (RT-PCR)

Bu adımda, RT-PCR için güvenilir ve hızlı analiz sağlayan çift sarmallı DNA'ya bağlanan boya (SYBR yeşili) içeren enzimlerin bir karışımı olan AmplifyMe SG Universal Mix (katalog numarası: AM02) ve miRNA qPCR SL Assay Kit of Suarge Biotechnology (katalog no: SUA-MIREXs) miRNA'ya özgü qPCR primerleri kullanıldı.

Kullandığımız RT-PCR cihazında bulunan termal döngüleyici sayesinde DNA amplifiye edilir ve florimetre sayesinde farklı dalga boylarındaki ışılmaları ölçer.

İşlem adımları:

- Kullanımdan önce tüm reaktifler buz üzerinde tamamen çözüldü, vortekslendi ve kısa süre döndürüldü.
- Buz üzerinde steril ve nükleaz içermeyen bir eppendorf tüpünde aşağıdaki miktarlarda reaksiyon reaktiflerini birleştirdikten sonra, pipetleme ile hafifçe karıştırılarak bir qPCR ana karışımı hazırlandı:

- 9 µL 2x AmplifyMe SG karışımı,
- 0,6 µL ileri (forward) primer (U6 veya miR-204-3p ve miR-223-3p)
- 0,6 µL geri (reverse) primer (evrensel)
- 0,4 µL 50x ROX solüsyonu,
- 5,4 µL PCR grade su 2 kat konsantre mix;
- TagNovaHS polimeraz, dNTP' ler, 6mM MgCl₂, PCR enhancer, stabilizatör ve optimize edilmiş tampon içerir.
- Hazırlanan bu karışım ve 3 uL cDNA her bir kuyucuğa pipetlendi ve nihai hacim 20 uL'ye eşitlendi.
- Her numune iki kez çalışıldı.

- 96 oyuklu plaka qPCR folyo ile kaplanmıştır.
- Hava kabarcıklarını gidermek ve alttaki sıvıyı toplamak için 1-2 dakika döndürüldü.
- Plak, Step One Plus RT-PCR cihazına aktarıldı ve qPCR reaksiyonu başlatıldı.

PCR koşulları;

- Hızlı döngüleyici modu ve SYBR Green kanalı seçildi.

Cihaza uygun protokol seçilir:

- Aktivasyon için 95°C 180 sn,
- 95°C denatürasyon için 3 sn,
- Primerlerin bağlanması, uzama ve floresan tayini için 30 saniye 60°C'ye ayarlandı.
- Denatürasyon ve primerlerin bağlandığı 40 döngü olarak yapılmıştır.
- Erime eğrisi koşulları cihaza göre 95°C 15 sn, 60°C 1 dk, 95°C 15 sn olarak ayarlandı ve istenilen hedef bölgenin yeniden üretilip üretilmediğini anlamak ve özgüllüğü artırmak için erime eğrisi analizi yapıldı.

3.5.1.5. Analiz- 2 ^{-ΔΔCT} Yöntemi

RT-PCR (qPCR); Gen ekspresyon düzeyini ölçmek için yaygın olarak kullanılan ve nükleik asitlerin duyarlı, spesifik ve amplifiye edici nicelikasyonunu sağlayan güçlü bir yöntemdir. Belirli bir dizinin tek bir kopyası bile bu yöntemle yeniden üretilebilir ve saptanabilir. PCR reaksiyonu, bir DNA şablonunu katlanarak çoğaltır. Başlangıçta mevcut olan hedef dizi miktarı ile herhangi bir döngüde biriken PCR ürünü arasında nicel bir ilişki vardır. Başka bir deyişle, başlangıçtaki DNA şablonu ile oluşan ürün arasında doğrudan bir orantı vardır. qPCR'de nicel nokta döngü eşiğidir (CT; eşik döngüsü). BT; Floresan sinyalinin minimum algılama sınırını, yani eşik aşması için gereken döngü sayısıdır. CT değeri, amplifikasyonun katlanarak arttığı fazın başlangıç noktasına karşılık gelir. Ayrıca, reaksiyonun başlangıcında ne kadar çok DNA bulunursa, eşik o kadar az döngü ulaşılır. Başka bir deyişle, DNA miktarı CT ile ters orantılıdır.

3.5.2. Plazma DTX1 Düzeyi Tayini

Plazma Deltex-1 düzeyinin tayininde “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) yöntemi kullanıldı. (Human Deltex-1ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, katalog numarası: E77404Hu; çalışma içi %varyasyon katsayısı (CV; coefficient of variation)<8, çalışmalar arası %CV<10).

3.5.2.1. Yöntemin Prensibi

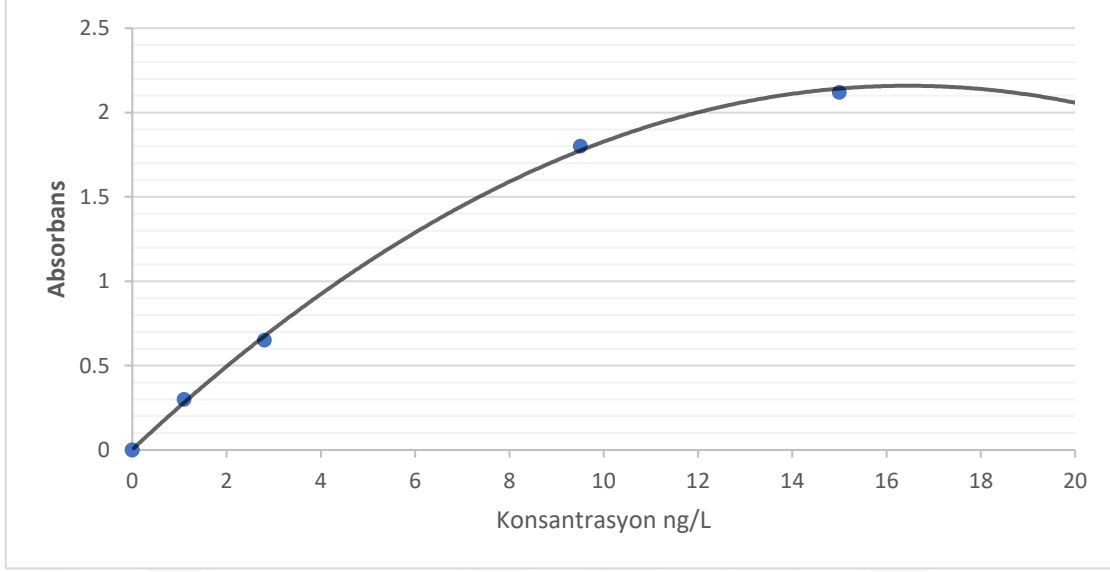
Bu kit tarafından plazmada DTX1'in kantitatif tayini için kullanılan yöntem sandviç ELISA'dır. İnsan DTX1 antikoru ile kaplanmış kuyuları içeren plakalara eklenen numunede bulunan DTX1 antijeni, kuyulardaki antikora bağlanır. Biotin etiketli insan DTX1 antikoru daha sonra eklenir. Bu biyotinik antikor, kuyucuklardaki antijene bağlanır ve bir sandviç formu (antikor-antijen-antikor) oluşturur. Besiyerine Horseradish Peroxidase (HRP) etiketli Streptavidin eklenir ve biotin ile DTX1 antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra kuyucuklara substrat solüsyonu eklenir ve DTX1 miktarı ile orantılı olarak renk değişimi gözlenir. Durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılır ve 450 nm'de absorbans ölçülür.

3.5.2.2. Kullanılan Ayraçlar

- Standart çözeltisi
- DTX1 antikoru kaplı 96 kuyucuklu ELISA plağı
- Standart diluenti
- HRP işaretli Streptavidin
- Durdurma çözeltisi
- Substrat çözeltisi A ve B
- Konsantre yıkama tamponu
- Biyotin işaretli insan DTX1 antikoru

3.5.2.3. Testin Yapılışı

- Reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler 30 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur.
- Standart solüsyonlar hazırlandıktan sonra belirtilen oranlarda dilüsyonlar yapılmıştır.
- Standart kuyucuklara 50 µL standart pipetlendi. Standart solüsyon biyotinlenmiş antikorlar içerdiğinden standart kuyulara antikor eklenmedi.
- Kuyucuklara 40 µL numune pipetlendikten sonra numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL anti-DTX1 antikorunu, numune ve standartların bulunduğu kuyucuklara ise 50 µL Streptavidin-HRP pipetlendi. Kuyular karıştırıldıktan sonra plaka kapatıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Plaka açıldı ve belirtilen oranda konsantre yıkama tamponununun distile su ile seyreltilmiş yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- Her kuyucuğa sırasıyla 50 µL substrat A ve 50 µL substrat B eklendi. Plaka kapatıldı ve karanlıkta 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi. Maviden sarıya değişti.
- Optik yoğunluk, durdurma solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içinde bir okuyucu kullanılarak 450 nm'de ölçülmüştür.
- Standart eğri oluşturuldu (*Şekil 3.5.2.3.1*).
- Numunelerin konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 3.5.2.3.1: Deltex-1 standart eğrisi

3.5.3. Plazma CTLA-4 Düzeyi Tayini

Plazma CTLA-4 düzeyinin tayininde ELISA yöntemi kullanıldı. (Human CTLA-4 ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, katalog numarası: E0277Hu; çalışma içi %CV<8, çalışmalar arası %CV<10).

3.5.3.1. Yöntemin Prensibi

Plazmada CTLA-4'ün kantitatif tayini için bu kit tarafından kullanılan yöntem sandviç ELISA'dır. İnsan CTLA-4 antikoruna ile kaplanmış kuyu içeren plakalara eklenen numunede bulunan CTLA-4 antijeni, kuyulardaki antikora bağlanır. Biotin-etiketli insan CTLA-4 antikoruna daha sonra eklenir. Bu biyotininik antikor, kuyucuklardaki antijene bağlanır ve bir sandviç formu (antikor-antijen-antikor) oluşturur. Ortama HRP etiketli Streptavidin eklenir ve biyotininlenmiş CTLA-4 antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra kuyucuklara substrat solüsyonu eklenir ve CTLA-4 miktarı ile orantılı olarak renk değişimi gözlenir. Reaksiyon, bir durdurma solüsyonu eklenerek sonlandırılır ve absorbans, 450 nm'de ölçülür.

3.5.3.2. Kullanılan Ayıraçlar

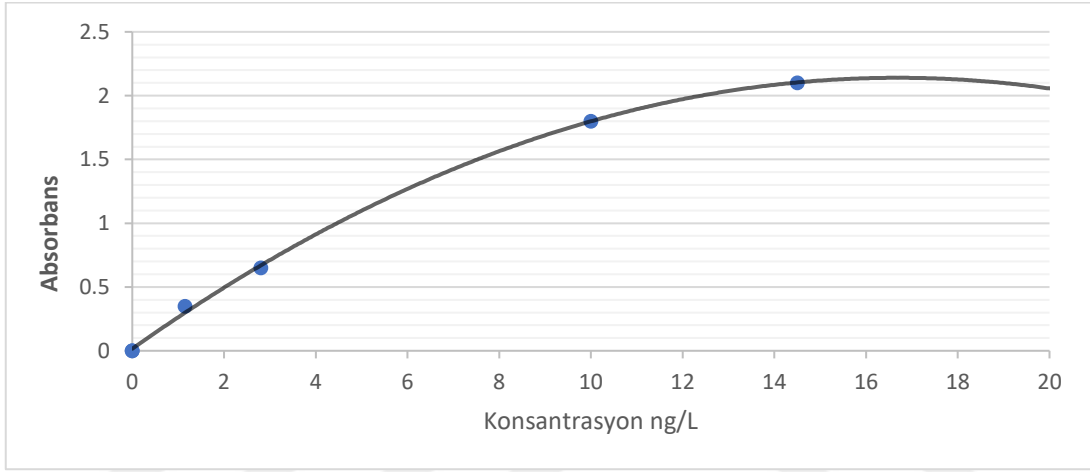
- Standart çözeltisi
- CTLA-4 antikoru kaplı 96 kuyucuklu ELISA plağı
- Standart diluenti
- HRP işaretli Streptavidin
- Durdurma çözeltisi
- Substrat çözeltisi A ve B
- Konsantre yıkama tamponu
- Biyotin işaretli insan CTLA-4 antikoru

3.5.3.3. Testin Yapılışı

- Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler 30 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur.
- Standart solüsyonlar hazırlandıktan sonra belirtilen oranlarda dilüsyonlar yapılmıştır.
- Standart kuyucuklara 50 µL standart pipetlendi. Standart solüsyon biyotinlenmiş antikorlar içerdiğinden standart kuyulara antikor eklenmedi.
- Kuyulara 40 µL numune pipetlendikten sonra numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL anti-CTLA-4 antikoru, numune ve standartların bulunduğu kuyucuklara ise 50 µL Streptavidin-HRP pipetlendi. Kuyular karıştırıldıktan sonra plaka kapatıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Plaka açıldı ve belirtilen oranda konsantre yıkama tamponununun distile su ile seyreltilmiş yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- Her kuyucuğa sırasıyla 50 µL substrat A ve 50 µL substrat B eklendi. Plaka

kapatıldı ve karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.

- Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi. Maviden sarıya değişti.
- Stop solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'de optik yoğunluk ölçümü yapıldı.
- Standart eğri oluşturuldu (*Şekil 3.5.3.3.1*).
- Numunelerin konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 3.5.3.3.1: CTLA-4 standart eğrisi

3.5.4. Plazma Pürin Düzeyi Tayini

Plazma pürin düzeyinin tayininde ELISA yöntemi kullanıldı. (Human Pürin ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, katalog numarası: E6050Hu; çalışma içi %CV<8, çalışmalar arası %CV<10).

3.5.4.1. Yöntemin Prensipleri

Bu kit tarafından plazmada pürinin nicel tayini için kullanılan yöntem sandviç ELISA'dır. İnsan pürin antikoru ile kaplanmış kuyuları içeren plakalara eklenen numunede bulunan pürin antijeni, kuyulardaki antikora bağlanır. Biotin etiketli insan leptin antikoru daha sonra eklenir. Bu biyotininik antikor, kuyucuklardaki antijene bağlanır ve bir sandviç formu (antikor-antijen-antikor) oluşturur. Ortama HRP etiketli Streptavidin eklenir ve biyotininlenmiş Pürin antikoruyla bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış

Streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra kuyucuklara substrat solüsyonu eklenir ve insan Pürini miktarı ile orantılı olarak renk değişimi gözlenir. Reaksiyon, bir durdurma solüsyonu eklenerek sonlandırılır ve absorbanans, 450 nm'de ölçülür.

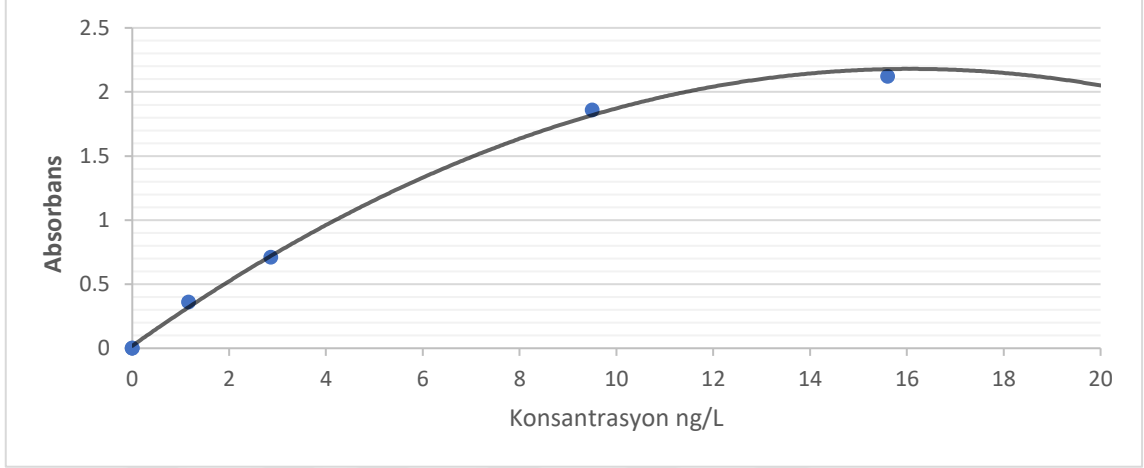
3.5.4.2. Kullanılan Ayıraçlar

- Standart çözeltisi
- Pürin antikoru kaplı 96 kuyucuklu ELISA plağı
- Standart diluenti
- HRP işaretli Streptavidin
- Durdurma çözeltisi
- Substrat çözeltisi A ve B
- Konsantre yıkama tamponu
- Biotin işaretli insan Pürin antikoru

3.5.4.3. Testin Yapılışı

- Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler 30 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur.
- Standart solüsyonlar hazırlandıktan sonra belirtilen oranlarda dilüsyonlar yapılmıştır.
- Standart kuyucuklara 50 µL standart pipetlendi. Standart solüsyon biyotinlenmiş antikolar içerdiğinden standart kuyulara antikor eklenmedi.
- Kuyulara 40 µL numune pipetlendikten sonra numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL anti-Pürin antikoru, numune ve standartların bulunduğu kuyucuklara ise 50 µL Streptavidin-HRP pipetlendi. Kuyular karıştırıldıktan sonra plaka kapatıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Plaka açıldı ve belirtilen oranda konsantre yıkama tamponununun distile su ile seyreltilmiş seyreltilmiş yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

- Her kuyucuğa sırasıyla 50 µL substrat A ve 50 µL substrat B eklendi. Plaka kapatıldı ve karanlıkta 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi. Maviden sarıya değişti.



Şekil 3.5.4.3.1: Pysin standart eğrisi

- Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'de optik yoğunluk ölçümü yapıldı.
- Standart eğri oluşturuldu (*Şekil 3.5.4.3.1*).
- Numunelerin konsantrasyonu hesaplandı

3.5.5. Rutin Test Parametreler için Kullanılan Yöntemler

Bireylerin rutin test parametreleri (kan glukoz düzeyleri, tam kan sayımı, karaciğer enzimleri) İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Fikret Biyal Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı' nda çalışılmıştır. Glukoz tayini için kullanılan metod heksokinaz yöntemidir (Roche Cobas c702, katalog no: 05168791). Serum glukoz düzeyi; “Plazma glukoz (mg/dL) = [- 0,137 + (18,951 X serum glukoz (mg/dL) / 18)]” formülü kullanılarak plazma glukoz düzeyine çevrilmiştir. İnsülin ve C-peptit tayini için kullanılan yöntem elektrokemilüminesans immun yöntemidir (ECLIA; electrochemiluminescent immunoassay) (Roche Cobas e602, sırasıyla katalog no: 12017547, 03184897). Karaciğer enzimleri tayini için kullanılan yöntem enzimatik-kolorimetrik metod (Roche Cobas c702, sırasıyla katalog no: 07528582, 07005768,

05171407, 05168538). Hasta ve kontrol grubunun rutin test sonuçları çalışma parametrelerinin kanlarının alındığı günkü değerleri olup dosyalarından elde edilmiştir. Hasta grubunun mutasyon dağılımı sonuçları da aynı şekilde dosyalarından alınmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan, en düşük (minimum), en yüksek (maksimum), frekans (n) ve yüzde (%) değerleri kullanıldı. Grup Karşılaştırmaları Student t testi, ROC eğrisi ROC analizi ile ve cinsiyet farkı Chi-square test ile analiz edildi. Nicel verilerin birbirleriyle olan ilişkisini değerlendirmek için Spearman Korelasyon analizi yapıldı. Verilerin analizinde SPSS 26.0 programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ düzeyi esas alınarak değerlendirildi.

miRNA' da gruplar arası kıyas yapmak ve korelasyon analizi için ΔCT değerleri hesaplandı. miRNA' nın hasta grubunda kontrol grubuna göre göreceli gen ekspresyonunun kat değişimini belirlemek için de $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri kullanıldı.



4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Romatolojisi Anabilim Dalı'nda AAA düzenli, takipli, 18 yaş altında olan 48 remisyon döneminde ve aynı demografik özelliklere sahip 36 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edildi.

4.1. Tanımlayıcı Özellikler ve Genel Laboratuvar Parametreleri

Kontrol grubu ve Hasta grubunun demografik özellikleri ve cinsiyet dağılımı **Tablo 4.1.1.**' de, Kontrol grubu ve Hasta grubunun laboratuvar sonuçları **Tablo 4.1.2.**'de, Hasta grubunun hastalık başlangıç yaşı, tanı yaşı ve AAA 50 skoru dağılımı **Tablo 4.1.3.**'de, Hasta grubunun kullandığı ilaçlar ve dağılımı **Tablo 4.1.4.**' te ve Hasta grubunun mutasyon dağılımı **Tablo 4.1.5.**'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1.1: Kontrol ve Hasta grubunun demografik özellikleri ve cinsiyet dağılımı

	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	P
	Ort.±s.s.	Ort.±s.s.	
Yaş (Yıl)	10 ± 4	12 ± 4	0,063 ^t
	n / %	n / %	
Cinsiyet	Kadın	13 / 36,1%	0,101 ^{x2}
	Erkek	23 / 63,9%	

^tt test / ^{x2}Ki-kare test

Ort.:Ortalama, S.S.: Standart Sapma

Hasta ve kontrol grubunda hastaların yaşları ve cinsiyet dağılımı anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir (**Tablo 4.1.1**).

Serum CRP düzeyleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (**Tablo 4.1.2**).

Serum AST, ALT, ESR düzeyleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$) (**Tablo 4.1.2**).

Tam kan HGB, MCH, MCHC ve RDW hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$) (**Tablo 4.1.2**).

Tam kan LYMPH, BASO, LYMPH, EOS ve BASO düzeyleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$) (*Tablo 4.1.2*).

Tam kan PLT, MPV, PCT ve PDW düzeyleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (*Tablo 4.1.2*).

Tablo 4.1.2: Kontrol ve hasta grubunun laboratuvar sonuçları

	Kontrol	Hasta	p
	Ort. ± S.S.	Ort. ± S.S.	
CRP (mg/dL)	1,20 ± 1,44	1,35 ± 1,67	0,658
AST (U/L)	20,85 ± 5,24	25,69 ± 13,03	0,023
ALT (U/L)	12,56 ± 3,95	19,63 ± 18,71	0,014
ESR (mm/h)	4,69 ± 1,81	11,23 ± 11,93	0,000
WBC (1000/ μ L)	7,12 ± 1,00	7,10 ± 1,41	0,934
RBC (M/uL)	4,92 ± 0,28	4,81 ± 0,34	0,122
HGB (gr/L)	13,96 ± 0,99	12,83 ± 1,27	0,000
HCT (%)	39,29 ± 2,35	38,21 ± 3,5	0,100
MCV (fL)	79,81 ± 2,64	79,28 ± 5,68	0,568
MCH (pg)	28,30 ± 1,15	26,68 ± 1,98	0,000
MCHC (gr/dL)	35,47 ± 0,73	33,50 ± 0,68	0,000
RDW (%)	13,63 ± 0,55	14,57 ± 1,64	0,000
PLT (K/uL)	283,43 ± 46,26	264,96 ± 59,17	0,125
MPV (fL)	8,80 ± 0,72	8,72 ± 0,92	0,671
PCT (μ g/L)	0,24 ± 0,04	0,22 ± 0,05	0,178
PDW (fL)	16,62 ± 0,39	16,58 ± 0,51	0,673
NEUT (K/uL)	3,59 ± 0,77	3,81 ± 1,47	0,369
LYMPH (K/uL)	2,83 ± 0,44	3,22 ± 0,91	0,012
MONO (K/uL)	0,56 ± 0,06	0,53 ± 0,15	0,192
EOS (K/uL)	0,21 ± 0,11	0,17 ± 0,17	0,208
BASO (K/uL)	1,69 ± 1,62	0,19 ± 0,85	0,000
NEUT (%)	48,84 ± 4,19	48,06 ± 11,85	0,674
LYMPH (%)	38,28 ± 4,16	42,74 ± 10,60	0,010
MONO (%)	8,23 ± 1,01	7,80 ± 1,96	0,197
EOS (%)	4,95 ± 1,77	2,43 ± 2,29	0,000
BASO (%)	1,11 ± 1,01	0,52 ± 0,24	0,001

Ort.: Ortalama, *S.S.*: Standart Sapma; *CRP*: C-Reaktif Protein; *AST*: Aspartat Aminotransferaz; *ALT*: Alanin aminotransferaz; *ESR*: Sedimentasyon Hızı; *WBC*: Lökosit; *RBC*: Eritrosit; *HGB*: Hemoglobin; *HCT*: Hematokrit; *MCV*: Ortalama eritrosit hacmi; *MCH*: Ortalama eritrosit hemoglobin; *MCHC*: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu; *RDW*: Kırmızı hücre dağılım genişliği; *PLT*: Trombosit; *MPV*: Ortalama trombosit hacmi; *PCT*: Prokalsitonin; *PDW*: Trombosit dağılım genişliği; *NEUT*: Nötrofil;

LYMPH: Lenfosit; **MONO:** Monosit; **EOS:** Eozinofil; **BASO:** Bazofil

Erkek ve kadınların hastalık başlangıç yaşları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı. Erkek ve kadın tanı yaşları arasında da istatistiksel olarak fark bulunmadı (*Tablo 4.1.3*).

Tablo 4.1.3: Hasta grubunun hastalık başlangıç yaşı, tanı yaşı ve AAA 50 skoru dağılımı

	n	Min.	Mak.	Ort. ± S.S.
Hastalık başlangıç yaşı (Yıl)	48	0	14	5,56 ± 3,60
Tanı yaşı (Yıl)	48	2	15	7,63 ± 3,65
AAA 50 skoru	48	5	11	7,33 ± 1,66

Ort.: Ortalama, *S.S.:* Standart Sapma

AAA ataklarını kontrol altına alabilmek ve daha da önemlisi amiloidoz gelişimini önleyebilmek amacıyla kullanılabilen tek ilaç kolşisinidir. Yeterli dozlarda kullanıldığında atak sayısında belirgin bir azalmaya neden olmaktadır. Tedavi dozu 1- 2 mg/gündür. Araştırmaya katılan AAA hastalarının %87,5'i (n=42) günde 1 mg, %10,4'ü (n=5) günde 1,5 mg ve %2,1'i (n=1) günde 0,7 mg kolşisin kullanmaktaydı (*Tablo 4.1.4*).

Tablo 4.1.4: Hasta grubunun kullandığı ilaçlar ve dağılımı

		Sıklık	Yüzde	Geçerli yüzde	Kümülatif Yüzde
Kullanılan ilaçlar	Kolşisin 0.5 x 2 mg/gün	42	87,5	87,5	87,5
	Kolşisin 0.5 x 3 mg/gün	5	10,4	10,4	97,9
	Kolşisin 0.7 mg/gün	1	2,1	2,1	100,0
	Total	48	100,0	100,0	

AAA hastalarında görülen en sık üç mutasyon sırasıyla M694V Heterozigot (%16,7,0; n=8), M694V R202Q Heterozigot (%12,5; n=6) ve MEFV (%12,5; n=6)'dir. AAA hastalarında görülen mutasyonlar ve sıklığı Tablo 4.1.5'te verilmiştir.

Tablo 4.1.5: Hasta grubunun mutasyon dağılımı

Mutasyon	Sıklık	Yüzde	Geçerli yüzde	Kümülatif Yüzde
E148Q/N	1	2,1	2,1	2,1
E148Q/N Heterozigot	1	2,1	2,1	4,2
E148Q/R202Q	1	2,1	2,1	6,3
K695R Heterozigot	1	2,1	2,1	8,3
M680I Heterozigot	1	2,1	2,1	10,4
M680I V720A	1	2,1	2,1	12,5
M680I V726A Compound Heterozigot	2	4,2	4,2	16,7
M694V	2	4,2	4,2	20,8
M694V Heterozigot	8	16,7	16,7	37,5
M694V R202Q Heterozigot	6	12,5	12,5	50,0
M694V/ R202Q	1	2,1	2,1	52,1
M694V/Homozigot	3	6,3	6,3	58,3
M694V/Homozigot R202Q Heterozigot	2	4,2	4,2	62,5
M694V/Homozigot R202Q Homozigot	4	8,3	8,3	70,8
M694V/V726 A Heterozigot	1	2,1	2,1	72,9
M694V Heterozigot R202Q Heterozigot	3	6,3	6,3	79,2
MEFV	6	12,5	12,5	91,7
MEFV V726A Homozigot	2	4,2	4,2	95,8
V726A Homozigot	1	2,1	2,1	97,9
V726A/ R202Q	1	2,1	2,1	100,0
Total	48	100,0	100,0	

4.2. miR-204-3p ve miR-223-3p Değerlendirmesi

4.2.1. Kontrol ve Hasta Grubuna Göre Kat Değişimi ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

Hasta grubu ΔCT değerinden kontrol grubu ΔCT değeri çıkarılarak $\Delta\Delta CT$ değeri hesaplandıktan sonra bu değer $2^{-\Delta\Delta CT}$ logaritmik değeri yani kat değişimi hesaplandı. Kontrol ve hasta grubuna göre hesaplanan miR-204-3p kat değişimleri **Tablo 4.2.1.1.** 'de, Kontrol ve hasta grubuna göre hesaplanan miR-223-3p kat değişimleri **Tablo 4.2.1.2.** 'de, Hasta grubunun kontrol grubuna göre hesaplanmış kat değişimi **Şekil 4.2.1.1'** de

gösterilmektedir.

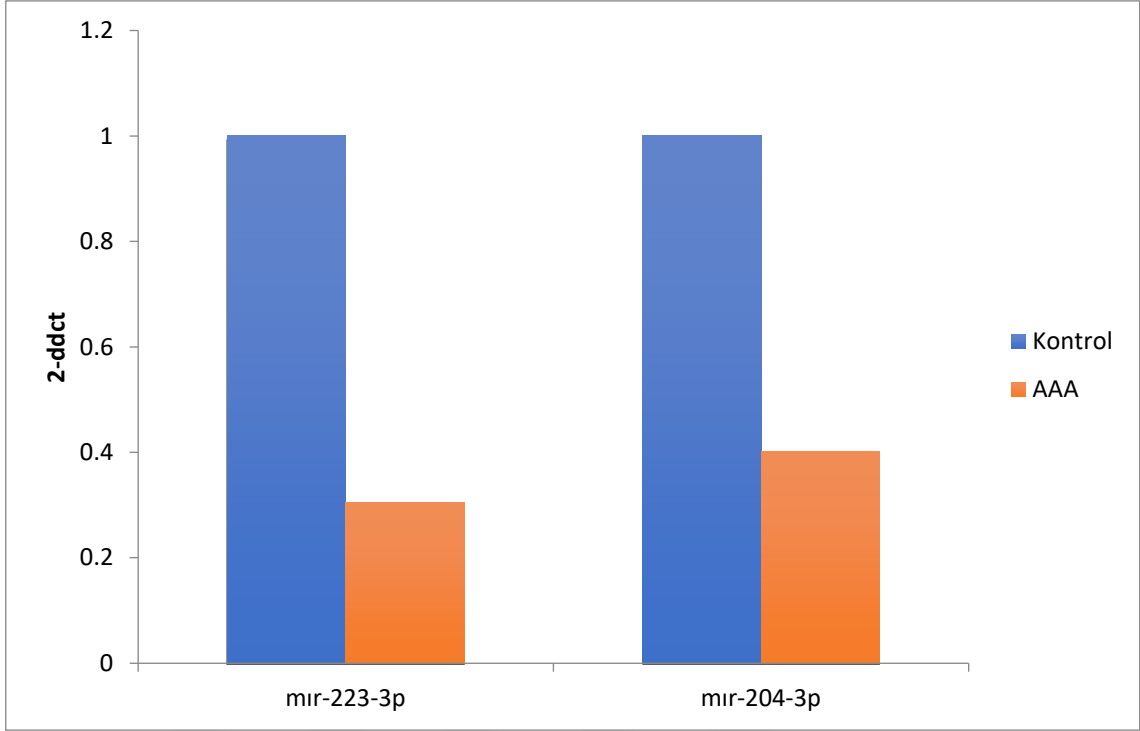
Tablo 4.2.1.1: Kontrol ve hasta grubuna göre hesaplanan miR-204-3p kat değişimleri

miR-204-3p		(SE of Mean of LOG)	(SE of Mean of LOG)
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	(+)	(-)
Kontrol	1	0,322	0,322
Hasta	0,401	0,147	0,147

Tablo 4.2.1.2: Kontrol ve hasta grubuna göre hesaplanan miR-223-3p kat değişimleri

miR-223-3p		(SE of Mean of LOG)	(SE of Mean of LOG)
	$2^{-\Delta\Delta CT}$	(+)	(-)
Kontrol	1	0,263	0,263
Hasta	0,30415	0,380	0,380

Hasta grubunun kontrol grubuna göre hesaplanmış kat değişimi miR-204-3p ($p=0,008$) ve miR-223-3p ($p=0,027$) düzeyleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (*Şekil 4.2.1.1*).



Şekil 4.2.1.1: Hasta grubunun kontrol grubuna göre hesaplanmış kat değişimi

4.3. Pürin, CTL-4 ve DTX1 düzeyleri

Kontrol ve Hasta grubunun Pürin, CTL-4 ve DTX1 düzeyleri ortalama, standart sapma ve p değeri **Tablo 4.3.1'** de gösterilmiştir.

Plazma Pürin ve DTX1 düzeyleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p > 0,05$) (**Tablo 4.3.1**).

Plazma CTLA-4 düzeyleri hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$) (**Tablo 4.3.1**).

Tablo 4.3.1: Kontrol ve Hasta grubunun plazma Pürin, CTL-4 ve DTX1 düzeyleri

	Kontrol	Hasta	p
	Ort ± S.S.	Ort ± S.S.	
Pürin (ng/L)	0,61 ± 0,35	0,97 ± 0,40	0,000
CTL-4 (ng/mL)	1,49 ± 0,50	1,49 ± 0,44	0,964
DTX1 (ng/mL)	1,51 ± 0,41	1,34 ± 0,34	0,036

Ort.: Ortalama, *S.S.:* Standart Sapma

4.4. Korelasyon Analizleri

Hasta grubu içindeki korelasyon verileri incelendiğinde, hastalık başlangıç yaşı ile AAA 50 skoru arasında negatif korelasyon bulundu ($r=-0,557$; $p<0,001$). CTL-4 ve pyrin düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulundu ($r=0,602$; $p<0,001$). CTL-4 ve DTX1 düzeyleri arasında da güçlü pozitif korelasyon bulundu ($r=0,740$; $p<0,001$).



5. TARTIŞMA

AAA, karın, göğüs veya eklemlerde tekrarlayan ağrılı inflamasyon atakları ile karakterize kalıtsal bir durumdur. Türkiye'nin ulusal otoinflamatuvar hastalığı diyebiliriz. Hastalığa 10 ekzondan oluşan ve 781 amino asitten oluşan bir proteini kodlayan MEFV genindeki mutasyonlar neden olur. Çoğu son derece nadir olan 50'den fazla hastalıkla ilişkili mutasyon tanımlanmıştır (1). Çalışmamızda AAA hastalarında görülen en sık üç mutasyon sırasıyla M694V Heterozigot (%16,7,0; n=8), M694V R202Q Heterozigot (%12,5; n=6) ve MEFV (%12,5; n=6)'dir. Sonuçlarımız literatür ile benzer şekilde mutasyonlar arasında, M694V, AAA hasta popülasyonunun yüzde 20 ila 80'i arasında değişen bir prevalans ile en sık görülenidir. AAA hastaları arasında homozigot M694V genotipinin yüzdesi değişkendir ve %36'ya ulaşabilir (241-243).

MEFV geni, çoğunlukla serozal hücrelerdeki nötrofillerde eksprese edilen pyrin adı verilen bir protein üretir (244). Çoğu hasta, protein marenostin/pyrin'i kodlayan MEFV geninde mutasyonlar taşır. Genetik kusur bilinmesine rağmen, bu kusurun inflamatuvar ataklara neden olduğu mekanizmalar büyük ölçüde belirsizdir. Tez çalışmasında plazma pyrin düzeyleri, AAA hastalığı olan çocuklarda kontrollere kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunurken, demografik, biyokimyasal veya klinik özellikler ile korelasyon göstermedi. Pyrin ektopik olarak eksprese edildiğinde veya susturulduğunda, IL-1 β prosesi ve salınımı pyrin seviyesiyle paralellik gösterir (245). Sonuç olarak, mononükleer fagositlerin endotoksin ile indüklenen aktivasyonu bağlamında, pyrin, IL-1beta prosesini ve salınımını arttırabilir. Pyrin muhtemelen düzenleyici inflamasyon yolunun bir parçasıdır ve normalde bağışıklık tepkisini ve kontrolsüz inflamasyonu devre dışı bırakarak inflamasyonu kontrol altında tutmaya yardımcı olabilir. Ayrıca, pyrin proteini muhtemelen bir kemotaktik faktörün (IL-8, C5a veya baskılayıcı hücreler) inhibitörü olarak da hareket edebilir (246). Bu bağlamda, inflamasyonun düzenlenmesinde pyrinin işlevi ile ilgili tartışmalar vardır. Hem engelleme hem de etkinleştirme işlevi varsayılmıştır (50,247-249). Bununla birlikte, pirin mutasyonlarının inflamatuvar yanıtlarla ilişkili olduğu gerçeği bu konseptte uygundur. Bu mutasyonlar fonksiyon kaybına neden olur ve pyrin inflamasyon fonksiyonunu down regüle eder. Sonuçlarımızı doğrulamak için daha fazla sayıda ve atak döneminde hasta ile farklı etnik gruplar üzerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

AAA, genellikle çocukluk çağında başlayan prototipik otoinflamatuvar bir hastalıktır. AAA hastalarında gözlenen inflamasyon, periferik dokulara nötrofil akışı ve akut faz reaktan proteinlerinin ve sitokinlerin serum konsantrasyonlarının artması ile karakterizedir (241). AAA'de doğal bağışıklık sisteminin aktive olduğu bildirilmiştir; ancak adaptif sistem disfonksiyonu bu hastalıkta geniş çapta araştırılmamıştır (250). T hücresi aktivasyonunda ilk immün denetim noktası CD152 olarak da bilinen CTLA4, birçok otoimmün hastalıkta yer almıştır (251-253). AAA bir otoimmün hastalık olmamasına ve patogenezinin T veya B hücrelerinin aktivasyonu ile ilişkili olmamasına rağmen; önceki çalışmalar, AAA'de Th1 hücre polarizasyonunun meydana gelebileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar AAA'de adaptif immün yanıtın dahil olduğunu gösterebilir (236,254). Ancak bu tez çalışmasında, plazma CTLA4 düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmamıştır. Gunesacar ve ark. 'nın (255) çalışmasında, AAA hastaları ve kontroller arasında CTLA-4 genindeki +49A/G polimorfizminin genotip ve alel frekanslarında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Aynı çalışmada, FMF'de CTLA-4 geninin -318 CT genotipi, T alleli ve -318T/+49A haplotip frekansındaki artışın, AAA'nin non-otoimmün patogenezi ile ilişkili olabileceği yönündedir. -318 T alelinin daha önce CTLA-4 geninin daha yüksek promotör aktivitesi ile ilişkili olduğu bildirildiğinden, AAA hastalarında önemli ölçüde daha sık görülen bir CT genotipi ve T aleli, bu otoinflamatuvar hastalıktaki antijen spesifik T hücre aktivasyonu ve otoantikorlar gibi otoimmün bulguların eksikliğini kısmen açıklayabilir. İlgi çekici bir şekilde, otoimmün hastalıklarda sadece sağlıklı donörlerle değil, aynı zamanda otoimmün olmayan hastalıklarla karşılaştırıldığında serum sCTLA-4'te bir artış bulunmuştur (256,257). Çalışmamızda plazma CTLA-4 düzeylerinde değişiklik olmaması AAA'de T hücre aktivasyonu olmadan sistemik inflamasyonun meydana geldiğini söyleyebiliriz. Bu nedenle, sCTLA-4 önemli bağışıklık düzenleyici işlevlere sahip olabilir ve etkisi, ilgili hücrelerin aktivasyon durumuna bağlı olabilir. AAA, adaptif immün sistemin rolü, doğal ve adaptif immün sistemler arasındaki etkileşim net değildir. Bu nedenle, T hücrelerine antijen sunumunu kontrol etmede rol oynayan CTLA-4'ün AAA patogenezindeki doğal ve adaptif bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşimin detaylı araştırılması gerekmektedir. AAA ve dolaşımdaki CTLA4 arasında bir ilişki varsa, bu bize AAA'nin patogenezi hakkında yeni bir fikir verir. Bu konunun aydınlatılması için AAA hastalarının atak döneminde ve daha büyük gruplar ile CTLA-4'ün işlevi araştırılmalıdır.

Ubikuitin-proteazom sistemi (UPS), ubikuitinlenmiş veya hasar görmüş proteinlerin hücre içi bozunması için ana bir yoldur ve ubikuitin aktive edici enzim (E1), ubikuitin eşlenik enzim (E2) ve ubikuitin ligaz (E3) dahil olmak üzere bir dizi enzim tarafından katalize edilen çok aşamalı enzimatik reaksiyonları içerir (258). Delteks-1 (DTX-1), prolin bakımından zengin bir motif içeren ubikuitin E3 ligazdır. DTX1'in, E3 ligaza bağımlı ve bağımsız mekanizmalar tarafından T hücresi aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmektedir. Deneysel çalışmalarda DTX1 delesyonunun, T hücrelerinin ve lupus benzeri otoimmün sendromların hiperaktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir (231), ancak insan otoimmün hastalıkları ile ilişkisi kesin olarak bilinmemektedir. SLE hastalarında düşük DTX1 ekspresyonu, aktif lupus nefriti, akciğer tutulumu veya hipokomplementemi ile ilişkili bulundu (259). Bu bulgular, DTX1'in insan T hücre fonksiyonunun negatif bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda T hücre fonksiyonunun negatif regülatörü olabileceği önerilmektedir. Bu etkisini IFN- γ üretimini arttırarak gösterdiği öne sürülmektedir (259). Yapılan literatür taramasına göre serum DTX1'in AAA'deki rolünü araştıran ilk çalışmadır. Bu tez çalışmasında plazma DTX1 düzeyleri AAA hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu. AAA'nin kesin patogenezi hala bilinmemekle birlikte sonuçlarımıza göre sirkülasyondaki DTX1'in AAA patogenezinde önemli bir rolü olduğuna dair güçlü kanıtlardır. DTX1 düzeylerindeki azalma IFN- γ üzerinden olabilir. DTX1, AAA hastalık aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayabilir ve potansiyel bir terapötik ajan olabilir. Ayrıca DTX1 ve CTLA4 düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulundu. Hastalar genellikle ataklar arasında asemptomatiktir ancak subklinik inflamasyon devam edebilir. Normal bir durumda hafif bir inflamasyona neden olan bir olay, AAA hastalarında ciddi bir inflamatuvar yanıtı neden olabilir. DTX1 ve CTLA4 düzeyleri, AAA'de subklinik inflamasyonu yansıtmak için noninvaziv, basit ve ucuz parametrelerdir. Gelecekte bu parametreler klinikte AAA'li hastalarda subklinik inflamasyonun saptanmasında, AAA'nin yıkıcı komplikasyonlarını (amiloidoz gibi) önlemede önemli olabilir.

Bazı hastalarda MEFV mutasyonu negatif bulunmuştur ve bu hastaların daha düşük oranla AAA aile öyküsüne sahip olan geç başlangıçlı AAA hastaları olduğu bildirilmiştir (260). Bununla birlikte, bu tür mutasyon içermeyen hastaların kesin varlığı, alternatif genlerdeki mutasyon ve olasılıkla da epigenetik düzensizliğin ortaya çıkması dahil olmak üzere hastalık gelişimi için ek nedenlerin varlığını göstermektedir (261). Bu epigenetik değişikliklerin tanımlanması hasta tanı ve takibi için önemlidir. Epigenetik

mekanizmalar arasında özellikle miRNA'ların etkileri geçtiğimiz yıllarda ön plana çıkmıştır. AAA hastalarında farklı miRNA'ların disregülasyonu gösterilmekle birlikte (216,224) pyrin proteinin post-translasyonel modifikasyondaki rolleri belirlenmemiştir. miRNA'ların ayrıca inflamatuvar uyarılara karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini düzenlediği gösterilmiştir (262). Hortu ve ark. (217) AAA hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla 11 miRNA'nın (miR-125a, miR-132, miR146a, miR-155, miR-15a, miR-16, miR-181a, miR-21, miR223, miR-26a ve miR-34a) ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde düşük olduğunu ortaya koydular. FMF hastalarının azalmış miR-132 ekspresyon seviyelerinin, bu miRNA'nın anti-inflamatuvar etkisinden olabileceğini öne sürmüşlerdir. Aynı zamanda AAA hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre miR181a ekspresyonu azalmış olmasına rağmen kolşisin tedavisi alan hastalarda almayanlara göre artmış bulundu. miR-181a ekspresyonunun inflamasyonun şiddeti ile negatif ilişkili olduğu düşünülürken, bu ekspresyonun gerçekte hangi yolla gerçekleştirildiği belirsizliğini koruyor. Aynı çalışmada kolşisin kullananlarda artmış miR-26a ekspresyonu bu miRNA'ların inflamasyonun farklı yollardan tetiklenmesine neden olduğu tahmin edilebilir. Faraoni ve ark. (263) FMF ve SLE, miR155 ile ilişkili ortak etyopatogenez mekanizmasına sahip olabileceğini bildirdiler. Latsoudis ve ark. (264) FMF hastalarında miR-4520a'nın ekspresyon değişikliğini göstermişler ve mTOR sinyalizasyonunun aktivatörü olarak FMF'de önemli rolü olan RHEB'in bu miRNA'nın hedefi olduğunu öne sürmüşlerdir. Wada ve ark. (215) dolaşımdaki miRNA'ların ekspresyon paternlerinin, FMF epizodları arasındaki MEFV mutasyonlarına dayalı olarak FMF alt grupları arasında farklılık gösterdiğini bildirdiler.

Yetişkinlerde dolaşımdaki CD4+ Treg'lerin miRNA profilinde, Foxp3 ve CTLA-4 ifadelerini düzenlediği miR-223 dahil birkaç miRNA'da doğrulandı (262). miR-223, T hücreyi aktivasyonunu kontrol eden bir "reostat" görevi gören miR-181 için önerilen role benzer şekilde, nötrofil duyarlılığının içsel bir modülatörüdür (265). Bu kapsamda çalışmamızda AAA patogenezi ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz CTLA-4 molekülü ve bu molekülü kodlayan geni hedef alan miR-223-3p ve DTX1 molekülü ile kodlayıcı genini hedef alan miR-204-3p'nin çalışılması hedeflenmiştir. Veritabanları incelemesi sonucu DTX1 genini hedef aldığını belirlediğimiz miRNA-204-3p'nin çalışılmasına karar verilmiştir. Çalışmada hesaplanmış kat değişimi miR-204-3p ve miR-223-3p düzeyleri, AAA hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmış bulundu. Ancak diğer parametrelerle aralarında ilişki bulunamadı. Bu sonuçlar,

miRNA'ların AAA'nin etyopatogenezindeki rolü olabileceğini desteklemektedir. Koga ve ark. (224)'nın sonuçlarına göre AAA hastalarında serum miR-204-3p düzeyleri yararlı bir biyobelirteç olma potansiyeline sahip olabileceğini bildirdiler. Aynı zamanda miR-204-3p, PI3Kg yolunu hedefleyerek AAA'de inflamatuvar sitokin (IL-6) üretimini inhibe ettiğini gösterdiler. Hortu ve ark. (217) AAA hasta grubunda miR-223'ün ekspresyonunu kontrol grubuna göre düşük olduğunu bildirdiler. Bu bulgular miR-223 ile ilgili sonucumuzu destekleyip, miR-223'ün FMF patogenezinde etkili olabileceğini göstermektedir. miR-223'ün nötrofillerde NLRP3'ün düzenlenmesinde önemli rollere sahip olduğu düşünülmektedir. IL-6 tarafından miR-223'ün down regülasyonunun IL-1 β ve IL-6 üretimini desteklediği bildirildi (230). Çalışmamız bu bulguları AAA'li hastalarda miR-223'ün azalmış ekspresyonu ile doğruladı. Literatürdeki birkaç çalışma, romatoid artrit (RA)'li hastaların periferik T hücrelerinde ve sinovyumunda miR-223 ekspresyonunun arttığını bildirerek, sonuçlarımızla çelişmektedir (266). Bununla birlikte, bu fark, miR-223'ün RA ve AAA 'ni farklı yollarla düzenlemesine bağlanabilir. Enflamasyonla ilişkili sistemik dolaşımda miRNA'lar tanımlanmış olmasına rağmen (267,268), bunların AAA'li bireylerdeki rolleri ve altta yatan mekanizmaları henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Serum miR-204-3p'nin AAA'yi diğer inflamatuvar hastalıklardan ayırt edip edemeyeceğini belirlemek ve hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi için serum miR-204-3p ölçümünün duyarlılığını ve özgüllüğünü belirlemek için ileriye dönük klinik çalışmalar yapılmalıdır.

Çalışmamızın en büyük kısıtlılığı hasta sayımızın nispeten az olması ve atak döneminde hasta grubumuzun olmamasıdır. Bunun nedeninin kan toplama aşamamızın Covid-19 pandemisine denk gelmesidir. Diğer taraftan çalışmamızda plazma pyrin ve DTX1 düzeylerinin araştırılması ve literatürde bu konuda benzer bir araştırmanın bulunmaması çalışmamızı özgün kılmaktadır. AAA hastalarında MEFV genini kodlayan pyrin proteininin plazma düzeylerinin artması apoptotik ve inflamatuvar sinyal yollarında önemli bir rolü olabilir. Pyrinin artması FMF mutasyonları varsayılan pyrin inflamazomlarının sensitivelerini arttırabilir. DTX1 düzeylerinde azalma, DTX1 ve CTL-4 arasında pozitif korelasyon AAA hastalarında ataksız dönemlerde subklinik inflamasyonun devam edebildiğini düşündürmektedir. Plazma DTX1 AAA'nın başlangıcında ve progresyonunda muhtemelen negatif akut faz reaktanı olarak görev almaktadır. AAA hastalarında ataksız dönemin subklinik inflamasyonunun izlenmesinde DTX1 düzeylerinin azalması önemli olabilir. Önceki araştırmalar ile uyumlu bir şekilde

AAA'de serum miR-204-3p ve miR-223-3p düzeylerinin azalması, proinflamatuvar sitokinler aracılığı ile olabilir. miR-204-3p ve miR-223-3p, AAA patogenezinde etkili olabilir. Bu sonuçları doğrulamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle, erken hastalığa duyarlılık, hastalık şiddeti, amiloidoz gelişme riski ve kolşisine direnç gibi kritik AAA belirtilerini aydınlatmak için daha kapsamlı araştırma yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Tufan A, Lachman HJ. Familial Mediterranean fever, from pathogenesis to treatment: a contemporary review. *Turk J Med Sci.* 2020; 50:1591-1610.
2. Ozen S, Batu ED. The myths we believed in familial Mediterranean fever: what have we learned in the past years *Semin Immunopathol.* 2015; 37(4):363-369.
3. Zadeh N, Getzug T, Grody WW. Diagnosis and management of familial Mediterranean fever: integrating medical genetics in a dedicated interdisciplinary clinic. *Genet Med.* 2011; 13(3): 263–9.
4. Bhatt H, Cascella M. *Familial Mediterranean Fever.* StatPearls Publishing. 2021.
5. Telatar M, Grody WW. Molecular genetic testing for familial Mediterranean fever. *Mol Genet Metab.* 2000; 71: 256–260.
6. Portincasa P, Scaccianoce G, Palasciano G. Familial mediterranean fever: a fascinating model of inherited autoinflammatory disorder. *Eur J Clin Invest.* 2013; 43(12):1314-27.
7. Rigante D, La Torraca I, Avallone L, Pugliese AL, Gaspari S, Stabile A. The pharmacologic basis of treatment with colchicine in children with familial Mediterranean fever. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2006; 10(4):173-178.
8. El-Shanti H, Majeed HA, El-Khateeb M. Familial Mediterranean fever in Arabs. *Lancet.* 2006; 367:1016–1024.
9. Aktaş A. Ailevi akdeniz ateşi hastalarında homozigot ve heterozigot mutasyona sahip hasta oranları ve iki grup arasında klinik farklılıklar. Uzmanlık tezi. 2016.
10. Kucuk A, Gezer İA, Ucar R, Karahan AY. Familial Mediterranean Fever. *Acta Medica.* 2014; 57(3): 97–104.
11. Ben-Chetri E, Touitou I. The impact of MEFV gene identification on FMF:an appraisal after15 years. *Clin Exp Rheumatol.* 2012; 30.3-6.
12. Tunca M, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, Ozen S, Topaloglu R, et al. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: Results of a nation wide multicenter study. *Medicine (Baltimore).* 2005; 84(1): 1–11.
13. Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, Siegel RM. Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12(8): 570–80.
14. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow Jr JE, Prosen L, Dean M, et al. Mapping

- of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med.* 1992; 326(23):1509-13.
15. Roberts RL, Stamp LK. Pharmacogenetic considerations in the treatment of gout. *Pharmacogenomics.* 2015; 16(6): 619-29.
 16. Group TFS. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine.* 2005; 84(1):1-11.
 17. La Regina M, Nucera G, Diaco M, Procopio A, Gasbarrini G, Notarnicola C, et al. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11:50–6.
 18. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial mediterranean fever in the world. *Arthritis Rheum.* 2009; 61(10):1447–53.
 19. Migita K, Uehara R, Nakamura Y, Yasunami M, Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, et al. Familial Mediterrenaen fever in Japan. *Medicine (Baltimore).* 2012;91: 337-43.
 20. Milenkovic By JM. Stojanovic DR. Najdanovic JG. Adaption to Mediterranea Physical Sciences, Engineering Technology. 2020.
 21. Lidar M, Livneh A. Familial Mediterranean Fever: clinical, molecular and advancements. *The Journal of Medicine.* 2007; 65(9):318-324.
 22. Drenth JPH, Van Der Meer JW. Hereditary periodic fever. *New England Journal of Medicine.* 2003; 345:1748-175.
 23. Çobankara V, Balkarlı A. Ailesel Akdeniz Ateşi. *Pam Med J.* 2011; 2:86- 98.
 24. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, et al. Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9:553–5.
 25. Onen F. Familial mediterranean fever. *Rheumatol Int.* 2006; 26(6): 489-496.
 26. Özel A, Demirtürk L, Yazgan Y. Familial Mediterranean Fever. A review of the disease and clinical and laboratory findings in 105 patients. *Dig Liver Dis.* 2000; 32:504-509.
 27. Özdoğan H. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Romatolojik Hastalıklar, Ailesel Akdeniz Ateşi Sempozyum. 2003; 63-66.
 28. Yigit S, Bagci H, Ozkaya O, Ozdamar K, Cengiz K, Akpolat T. MEFV mutations in patients with familial mediterranean fever in the black sea region of Turkey: Samsun Experience. *J Rheumatol.* 2008; 35:106–113.
 29. Korkmaz DT, Atak PG, Çelik C. Frequencies of the common mefv gene mutations in

- Adiyaman, Southeast Anatolia, Turkey. *Balkan J Med Genet.* 2014; 17:67–71.
30. The Turkish FMF Study Group. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: The results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore).* 2005; 84:1–11.
 31. Bilgen SA, Kilic L, Akdogan A, Kiraz S, Kalyoncu U, Karadag O, et al. Effects of anti-tumor necrosis factor agents for familial mediterranean fever patients with chronic arthritis and/or sacroiliitis who were resistant to colchicine treatment. *J Clin Rheumatol.* 2011; 17(7): 358-362.
 32. Gasparyan AY, Ayvazyan L, Blackmore H, Kitas GD. Writing a narrative biomedical review: considerations for authors, peer reviewers, and editors. *Rheumatology international.* 2011; 31(11):1409.
 33. Berkun Y, Padeh S, Reichman B, Zaks N, Rabinovich E, Lidar M, et al. A single testing of serum amyloid a levels as a tool for diagnosis and treatment dilemmas in familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum.* 2007; 37(3):182–188.
 34. Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL, Aksentijevich I. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019; 10: 1745.
 35. Peynircioğlu B, Engin Y. Ailevi Akdeniz ateşi hastalığının moleküler temeli. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2006; 37:223-229.
 36. Stojanov S, Kastner DL. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol.* 2005; 17(5): 586–599.
 37. Stoffels M, Szperl A, Simon A, Netea MG, Plantinga TS, van Deuren M, et al. MEFV mutations affecting pyrin amino acid 577 cause autosomal dominant autoinflammatory disease. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(2):455–61.
 38. Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, Barham B, Le JM. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum.* 2009; 60(6): 1851-1861.
 39. Tunca M, Ben-Chetrit E. Familial Mediterranean fever in 2003. Pathogenesis and management. *Clinical and experimental Rheumatology.* 2003; 21: 49-52.
 40. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, et al. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276(42): 39320-39329.
 41. Alehashemi S, Goldbach-Mansky R. Human Autoinflammatory Diseases Mediated by NLRP3-, Pyrin-, NLRP1-, and NLRC4-Inflammasome Dysregulation Updates on Diagnosis, Treatment, and the Respective Roles of IL-1 and IL-18. *Front Immunol.*

- 2020; 11: 1840.
42. Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, Cesena T. Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2002; 20: S45-53.
 43. Chae JJ, Wood G, Richard K, Jaffe H, Colburn NT, Masters SL, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF- κ B through its N-terminal fragment. *Blood*. 2008; 112(5): 1794-1803.
 44. Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J*. 2001; 20(9): 2140-2151.
 45. Grandemange S, Aksentijevich I, Jeru I, Gul A, Touitou I. The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. *Genes Immun*. 2011; 12(7): 497-503.
 46. Baskin E, Saatci U. Familial Mediterranean Fever. *Curr Rheumatol Rev*. 2006; 2(1): 101-8.
 47. Lucherini OM, Rigante D, Sota J, Fabiani C, Obici L, Cattalini M, et al. Updated overview of molecular pathways involved in the most common monogenic autoinflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2018; 36 Suppl 110(1):3-9.
 48. Alghamdi M. Familial Mediterranean fever, review of the literature. *Clin Rheumatol*. 2017; 36: 1707- 1713.
 49. Barakat MH, Malhas LN, Gumaa KK. Catecholamine metabolism in recurrent hereditary polyserositis. Pathogenesis of acute inflammation: The retention leakage hypothesis. *Biomed Pharmacother*. 1989; 43: 763-769.
 50. Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2000; 95(10): 3223-3231.
 51. Dunder M, Emirogullari EF, Kiraz A, Taheri S, Baskol M. Common Familial Mediterranean Fever gene mutations in a Turkish cohort. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(8): 5065–5069.
 52. Cobankara V, Balkarli A. Ailesel Akdeniz Ateşi. *Pam Med J*. 2011; 4(2): 86–98.
 53. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet*. 2001; 9: 473-483.
 54. Mattit H, Joma M, Al-Cheikh S, El-Khateeb M, Medlej-Hashim M, Salem N, et al.

- Familial Mediterranean fever in the Syrian population: gene mutation frequencies, carrier rates and phenotype-genotype correlation. *Eur J Med Genet.* 2006; 49(6): 481-486.
55. Touitou I. Standardized testing for mutations in familial Mediterranean fever. *Clin Chem.* 2003; 49: 1781-1782.
56. Sönmez HE, Batu E, Özen S. Familial Mediterranean fever: current perspectives. *J Inflamm Res.* 2016; 17; 9:13-20.
57. Yigit S, Karakus N, Tasliyurt T, Kaya SU, Bozkurt N, Kisacik B. Significance of MEFV gene R202Q polymorphism in Turkish familial Mediterranean fever patients. *Gene.* 2012; 506(1): 43–45.
58. Sönmezgöz E, Özer S, Gül A, Yılmaz R, Kasap T, Takcı Ş, et al. Clinical and Demographic Evaluation According to MEFV Genes in Patients with Familial Mediterranean Fever. *Biochem Genet.* 2019; 57(2): 289–300.
59. Kogan A, Shinar Y, Lidar M, Revivo A, Langevitz P, Padeh S, Pras M, Livneh A. Common MEFV mutations among Jewish ethnic groups in Israel: high frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *Am J Med Genet.* 2001; 102(3): 272-276.
60. Duzova A, Bakkaloglu A, Besbas N. Role of A-SAA in monitoring subclinical inflammation and in colchicine dosage in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol.* 2003; 21: 509-514.
61. Barron KS, Kastner DL. Periodic Fever Syndromes and Other Inherited Autoinflammatory Diseases. *Text Pediatr Rheumatol.* 2011; 642–660.
62. Federici S, Sormani MP, Ozen S, Aktay N, Cakar N, Düzova A, et al. Evidence-based provisional clinical classification criteria for autoinflammatory periodic fevers. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74: 799–805.
63. Yalçinkaya F, Group TFS. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine.* 2005; 84: 1–11.
64. Üstebay S, Üstebay D, Yılmaz Y. Ailevi Akdeniz Ateşi. *JAREM* 2015; 5: 89-93
65. Kasapçopur Ö, Arısoy N. Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer otoenflamatuar hastalıklar Derleme. *Türk Pediatri Arşivi.* 2006; 41(1): 9-17.
66. Berkun Y, Eli M. Eisenstein. Diagnostic criteria of familial Mediterranean fever. *Autoimmun Rev.* 2014; 13(4-5): 388-390.
67. Yalçinkaya F, Özen S, Özçakar ZB, Aktay N, Çakar N, Düzova A, et al. A new set of

- criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology*. 2009; 48:395-398.
68. Gattorno M, Hofer M, Federici S, Vanoni F, Bovis F, Aksentijevich I, et al. Classification criteria for autoinflammatory recurrent fevers. *Ann Rheum Dis*. 2019; 78: 1025–32.
69. Köhler BM, Lorenz HM, Blank N. IL1-blocking therapy in colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Eur J Rheumatol*. 2018; 5(4):230-234.
70. Sönmez AÖ, Sönmez HE, Çakan M, Yavuz M, Keskindemirci G, Aktay Ayaz N. The evaluation of anxiety, depression and quality of life scores of children and adolescents with familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int*. 2020; 40(5): 757-763.
71. Fonnesu C, Cerquaglia C, Giovinale M, Curigliano V, Verrecchia E, de Socio G, et al. Familial Mediterranean Fever: a review for clinical management. *Joint Bone Spine*. 2009; 76(3): 227-33.
72. Kallinich T, Haffner D, Niehues T, Huss K, Lainka E, Neudorf U, et al. Colchicine use in children and adolescents with familial Mediterranean fever: literature review and consensus statement. *Pediatrics*. 2007; 119(2): e474-83.
73. Ozen S, Ayaz NA, Lainka E, Duzova A, Bakkaloglu A, Kallinich T. Disease severity in children and adolescents with familial Mediterranean fever: a comparative study to explore environmental effects on a monogenic disease. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68; 246-248.
74. Sönmez HE, Esmeray P, Batu ED, Arıcı ZS, Demir S, Sağ E, Özen S, Bilginer Y. Is age associated with disease severity and compliance to treatment in children with familial Mediterranean fever? *Rheumatol Int*. 2019; 39(1):83–7.
75. Aydın F, Özçakar ZB, Yalçınkaya F. Çocuklarda Ailesel Akdeniz Ateşi Tanı ve Tedavisi, *Türkiye Klinikleri Journal of Rheumatology - Special Topics*. 2017; 10(1), 46-56.
76. Yuval Y, Hemo-Zisser M, Zemer D, Sohar E, Pras M. Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever (FMF). *Am J Med Genet*. 1995; 57(3): 455-457.
77. Koşan C. Ailevi Akdeniz Ateşine tanısal yaklaşım. *Atatürk Üniversitesi Tıp Dergisi*. 2003; 35: 1-6.
78. Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2003; 18(9): 853-9.

79. Ozturk C, Halicioglu O, Coker I, Gulez N, Sutcuoglu S, Karaca N, Aksu G, Kutukculer N. Association of clinical and genetical features in FMF with focus on MEFV strip assay sensitivity in 452 children from western Anatolia, Turkey. *Clin Rheumatol.* 2012; 31(3): 493-501.
80. Simon A, van der Meer JW, Drenth JP. Familial Mediterranean fever—a not so unusual cause of abdominal pain. *Best practice & research Clinical gastroenterology.* 2005; 19(2): 199-213.
81. Mor A, Gal R, Livneh A. Abdominal and digestive system associations of familial Mediterranean fever. *The American journal of gastroenterology.* 2003; 98(12): 2594-604.
82. Shinar Y, Obici L, Aksentijevich I, Bennetts B, Austrup F, Ceccherini I, et al. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(10):1599–1605.
83. Lidar M, Kedem R, Mor A, Levartovsky D, Langevitz P, Livneh A. Arthritis as the sole episodic manifestation of familial Mediterranean fever. *J Rheumatol.* 2005; 32(5):859–62.
84. Solmaz Ö, Ataş B, Karaibrahimoğlu A, Clinical, Laboratory and Epidemiological Characteristics of Familial Mediterranean Fever in Childhood and The Relationship Between These Features with Genetic Mutations. *Selçuk Tıp Derg.* 2016; 32(1):1-7.
85. Desnick RJ. The porphyrias. In: In Isselbacher KJ, ed. *Harrison's principle of internal medicine*, 13. edition New York: Mc Graw Hill. 1994; 2073-79.
86. Jarjour RA, Dodaki R. Arthritis patterns in familial Mediterranean fever patients and association with M694V mutation. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(3):2033–2036.
87. Lidar M, Yaqubov M, Zaks N, Ben-Horin S, Langevitz P, Livneh A. The prodrome: a prominent yet overlooked pre-attack manifestation of familial Mediterranean fever. *J Rheumatol.* 2006; 33:1089–1092.
88. Almeida de Jesus A, Goldbach-Mansky R. Monogenic autoinflammatory diseases: concept and clinical manifestations. *Clin Immunol.* 2013; 147(3): 155-174.
89. Medlej-Hashim M, Delague V, Chouery E, Salem N, Rawashdeh M, Lefranc G, et al. Amyloidosis in familial Mediterranean fever patients: correlation with MEFV genotype and SAA1 and MICA polymorphisms effects. *BMC Med Genet.* 2004; 5:4.

90. Lega JC, Khouatra C, Cottin V, Cordier JF. Isolated recurrent pleuritis revealing familial Mediterranean fever in adulthood. *Respiration*. 2010; 79: 508–510.
91. Lidar, M, Pras, M, Langevitz, P, Livneh A, Thoracic and Lung Involvement in Familial Mediaterranean Fever, *Clinics in Chest Medicine*. 2002; 23, 505-511.
92. Ruiz XD, Gadea CM. Familial Mediterranean fever presenting with pulmonary embolism. *Conn Med*. 2011; 75:17–19.
93. Cefle A, Kamali S, Sayarlioglu M, Inanc M, Ocal L, Aral O, et al. A comparison of clinical findings of familial Mediterranean fever patients with and without amyloidosis. *Rheumatology international*. 2005; 25(6):442-6.
94. Sari İ, Birlik M, Kasifoğlu T. Familial Mediterranean fever: An updated review. *Eur J Rheumatol*. 2014; 1(1): 21-33.
95. Brik R, Shinawi M, Kepten I, Berant M, Gershoni-Baruch R. Familial Mediterranean fever: clinical and genetic characterization in a mixed pediatric population of Jewish and Arab patients. *Pediatrics*. 1999; 103(5):70.
96. Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multi- center study. *Medicine (Baltimore)*. 2005; 84:1–11.
97. Majeed HA, Quabazard Z, Hijazi Z, Farwana S, Harshani F. The cutaneous manifestations in children with Familial Mediterranean Fever (recurrent hereditary polyserositis). A six-year study *Q J Med* 1990; 75:607–616.
98. Topaloglu R, Ozaltin F, Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Besbas N, et al. E148Q is a disease-causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005; 64(5):750-752.
99. Cekin N, Akyurek ME, Pinarbasi E, Ozen F. MEFV mutations and their relation to major clinical symptoms of familial Mediterranean fever. *Gene*. 2017; 626: 9–13.
100. Majeed HA, Al-Qudah AK, Qubain H, Shahin HM, editors. The clinical patterns of myalgia in children with familial Mediterranean fever. *Seminars in arthritis and rheumatism*; Elsevier. 2000; 138-143.
101. Cakan M, Karadag SG, Ayaz NA. Corticosteroid-resistant anakinra-responsive protracted febrile myalgia syndrome as the first manifestation of familial Mediterranean fever. *North Clin Istanbul*. 2019; 7(1): 78-80.

102. Yıldırım D.G, Sevcan A, Bakkaloglu, Buyan N. Protracted febrile myalgia as a challenging manifestation of familial Mediterranean fever: case-based review. *Rheumatol Int.* 2019; 39(1): 147-152.
103. Brik R, Shinawi M, Kasinetz L, Gershoni-Baruch R. The musculoskeletal manifestations of familial Mediterranean fever in children genetically diagnosed with the disease. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1416–1419.
104. Girisgen I, Sonmez F, Koseoglu K, Erisen S, Yilmaz D. Polyarteritis nodosa and Henoch-Schonlein purpura nephritis in a child with familial Mediterranean fever: a case report. *Rheumatol Int.* 2012; 32(2): 529-533.
105. Demir S, Sag E, Dedeoglu F, Ozen S. Vasculitis in Systemic Autoinflammatory Diseases. *Front Pediatr.* 2018; 6: 377.
106. Paşa S, Altıntaş A, Devecioğlu B, Cil T, Danis R, Isi H, et al. Familial Mediterranean Fever gene mutations in the Southeastern region of Turkey and their phenotypical features. *Amyloid.* 2008; 15: 49-53.
107. Ozen S. The changing face of polyarteritis nodosa and necrotizing vasculitis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017; 13(6): 381-386.
108. Gershoni-Baruch R, Broza Y, Brik R. Prevalence and significance of mutations in the familial Mediterranean fever gene in Henoch-Schönlein purpura. *The Journal of pediatrics.* 2003; 143(5): 658-61.
109. Özçahar ZB, Yalcinkaya F, ÇAKAR N, Acar B, Kasapcopur O, Ugüten D, et al. MEFV mutations modify the clinical presentation of Henoch-Schönlein purpura. *J Rheumatol.* 2008; 35(12): 2427-2429.
110. Senel K, Melikoglu MA, Baykal T, Melikoglu M, Erdal A, Ugur M. Protracted febrile myalgia syndrome in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol.* 2010; 20: 410–412.
111. Fraisse T, Savey L, Hentgen V, Rossi-Semerano L, Koné-Paut I, Grateau G, et al. Non-amyloid liver involvement in familial Mediterranean fever: A systematic literature review. *Liver Int.* 2020; 40(6): 1269-1277.
112. Kalyoncu U, Eker A, Oguz KK, Kurne A, Kalan I, Topcuoglu AM, et al. Familial Mediterranean fever and central nervous system involvement: a case series. *Medicine.* 2010; 89(2): 75-84.
113. Neokleous A, Psarelis S, Parperis KM. Aseptic Meningitis in Hereditary Autoinflammatory Diseases. *Cureus.* 2020; 12(5): e8244.

114. Keddie S, Parker T, Lachmann HJ, Ginsberg L. Cryopyrin-associated periodic fever syndrome and the nervous system. *Curr Treat Options Neurol.* 2018; 20: 43.
115. Capron J, Grateau G, Steichen O. Is recurrent aseptic meningitis a manifestation of familial Mediterranean fever? A systematic review. *Clin Exp Rheumatol.* 2013; 31: 127–132.
116. Lange-Sperandio B, Möhring K, Gutzler F, Mehls O. Variable expression of vasculitis in siblings with familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol.* 2004; 19(5): 539-543.
117. Rigante D, Lopalco G, Tarantino G, Compagnone A, Fastiggi M, Cantarini L. Non-canonical manifestations of familial Mediterranean fever: a changing paradigm. *Clin Rheumatol.* 2015; 34(9):1503-1511.
118. Mijatovic V, Hompes PG, Wouters MG. Familial Mediterranean fever and its implications for fertility and pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 10; 108(2):171-176.
119. Kivity S, Danilesko I, Ben-Zvi I, Gilburd B, Kukuy OL, Rahamimov R, et al. Serum Amyloid a Levels in Kidney-Transplanted patients with Familial Mediterranean Fever-Amyloidosis. *Imaj.* 2011; 13: 202-5.
120. Siligato R, Gembillo G, Calabrese V, Conti G, Santoro D. Amyloidosis and Glomerular Diseases in Familial Mediterranean Fever. *Medicina (Kaunas).* 2021; 1;57(10):1049.
121. Kasifoglu T, Bilge SY, Sari I, Solmaz D, Senel S, Emmungil H, et al. Amyloidosis and its related factors in Turkish patients with familial Mediterranean fever: a multicentre study. *Rheumatology.* 2014; 53(4):741–5.
122. Galeazzi M, Gasbarrini G, Ghirardello A, Grandemange S, Hoffman HM, Manna R, et al. Autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Rheumatol.* 2006; 24(1 Suppl 40): S79-85.
123. Yilmaz E, Balci B, Kutlay S, Ozen S, Ertürk S, Oner A, et al. Analysis of the modifying effects of SAA1, SAA2 and TNF-alpha gene polymorphisms on development of amyloidosis in FMF patients. *Turk J Pediatr.* 2003; 45(3): 198–202.
124. Örün E, Yalçınkaya F. Türk tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı ve amiloidoz. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi.* 2003; 12: 1-7.
125. Yıldız A, Akkaya V, Kılıçaslan R. Cardiac and intestinal amyloidosis in a renal transplant recipient with familial Mediterranean fever. *J Nephrol.* 2001; 14: 125-127.

126. Shiora M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A, Sagara J. ASC, which composed of a PYD and CARD, is up regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochemistry Biophysics Research Communications*. 2002; 293: 1314-1318.
127. Korkmaz C, Özdoğan H, Kasapçopur Ö, Yazıcı H. Acute phase response in Familial Mediterranean Fever. *Ann Rheum Dis*. 2002; 6: 79- 81.
128. Makay B, Türkyilmaz Z, Ünsal E. Mean platelet volume in children with familial Mediterranean fever. *Clinical rheumatology*. 2009; 28(8): 975-978.
129. Haghighat M, Derakhshan A, Karamifar H. Familial Mediterranean Fever. *Shiraz E Medical Journal*. 2006; 7:1-18.
130. Atagunduz MP, Tuglular S, Kantarci G, Akoglu E, Direskeneli H. Association of FMF-related (MEFV) point mutations with secondary and FMF amyloidosis. *Nephron Clin Pract*. 2004; 96(4):131-135.
131. Ozen S, Demirkaya E, Erer B, Livneh A, Ben-Chetrit E, Giancane G, et al. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75(4): 644–651.
132. Portincasa P. Colchicine, Biologic Agents and More for the Treatment of Familial Mediterranean Fever. The Old, the New, and the Rare. *Curr Med Chem*. 2016; 23(1): 60-86.
133. Cerquaglia C, Diaco M, Nucera G, La Regina M, Montalto M, Manna R. Pharmacological and Clinical Basis of Treatment of Familial Mediterranean Fever (FMF) with Colchicine or Analogues: An Update. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(1): 117-124.
134. Slobodnick A, Shah B, Pillinger MH, Krasnokutsky S. Colchicine: old and new. *Am J Med*. 2015; 128(5): 461-470.
135. Nerlekar N, Beale A, Harper RW. Colchicine—a short history of an ancient drug. *Med J Aust*. 2014; 201: 687–688.
136. Nuki G. Colchicine: its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation. *Curr Rheumatol Rep*. 2008; 10:218–27.
137. Rollot F, Pajot O, Chauvelot-Moachon L, Nazal E.V, Kelaidi C, Blanche P. Acute colchicine intoxication during clarithromycin administration. *Ann Pharmacother*. 2004; 38(12): 2074-2077.
138. Dasgeb B, Kornreich D, McGuinn K, Okon L, Brownell I, Sackett DL. Colchicine:

- an ancient drug with novel applications. *Br J Dermatol.* 2018; 178(2): 350–356.
139. Tunca M. Colchicine 2011. *RAED Dergisi* 2012; 4(1): 11-16.
140. Migita K, Asano T, Sato S, Koga T, Fujita Y, Kawakami A. Familial Mediterranean fever: overview of pathogenesis, clinical features and management. *Immunol Med.* 2018; 41(2): 55–61.
141. Padeh S. Periodic fever syndromes. *Pediatr Clin North Am.* 2005; 52(2): 577-609.
142. Livneh A, Langevitz P. Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2000; 14(3): 477-498.
143. De Benedetti F, Gattorno M, Anton J, Ben-Chetrit E, Frenkel J, Hoffman HM, et al. Canakinumab for the treatment of autoinflammatory recurrent fever syndromes. *N Engl J Med.* 2018; 378(20): 1908-1919.
144. Padeh S, Gerstein M, Berkun Y. Colchicine is a safe drug in children with familial Mediterranean fever. *J Pediatr.* 2012; 161(6): 1142–1146.
145. Toplak N, Dolezalová P, Constantin T, Sedivà A, Pašić S, Čižnar P, et al.; Eastern/Central European autoinflammatory collaborating group for the Paediatric Rheumatology International Trials Organization (PRINTO) and Eurofever Project. Periodic fever syndromes in Eastern and Central European countries: results of a pediatric multinational survey. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2010; 8: 29.
146. Cakar N, Yalçinkaya F, Ozkaya N, Tekin M, Akar N, Koçak H, et al. Familial Mediterranean fever (FMF)-associated amyloidosis in childhood. Clinical features, course and outcome. *Clin Exp Rheumatol.* 2001; 19(5 Suppl 24): S63-7.
147. Abraham Gedalia (Çeviri: K.Öztarhan), Behrman R., Kliegman R. Jenson H.(Edit.) *FMF Nelson Pediatrics.* Nobel Tıp Kitabevi. 2008; 821-822.
148. Ozturk MA, Kanbay M, Kasapoglu B, Onat AM, Guz G, Furst DE, et al. Therapeutic approach to familial Mediterranean fever: a review update. *Clin Exp Rheumatol.* 2011; 29: 77-86.
149. Batu ED, Arici ZS, Bilginer Y, Özen S. Current therapeutic options for managing familial Mediterranean fever. *Journal Expert Opinion on Orphan Drugs.* 2015; 3:9, 1063-1073.
150. Finkelstein Y, Aks SE, Hutson JR, Juurlink DN, Nguyen P, Dubnov-Raz G, et al. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug. *Clin Toxicol.* 2010; 48(5): 407–414.

151. Richette P, Frazier A, Bardin T. Pharmacokinetics considerations for gout treatments. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014; 10: 949–957.
152. Jayaprakash V, Ansell G, Galler D. Colchicine overdose: the devil is in the detail. *N Z Med J.* 2007; 120(1248): U2402.
153. Varughese GI, Varghese AI, Tahrani AA. Colchicine: time to rethink. *N Z Med J.* 2007; 120(1249): U2429.
154. Ozen S, Bilginer Y, Aktay Ayaz N, Calguneri M. Anti-interleukin 1 treatment for patients with familial Mediterranean fever resistant to colchicine. *J Rheumatol.* 2011; 38: 516–518.
155. Mitroulis I, Papadopoulos VP, Konstantinidis T, Ritis K. Anakinra suppresses familial Mediterranean fever crises in a colchicine-resistant patient. *Neth J Med.* 2008; 66: 489–491.
156. Ozdogan H, Ugurlu S. Canakinumab for the treatment of familial Mediterranean fever. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017; 13(5): 393-404.
157. Hashkes PJ, Spalding SJ, Giannini EH, Huang B, Johnson A, Park G, et al. Rilonacept for colchicine-resistant or -intolerant familial Mediterranean fever: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2012; 157(8): 533-541.
158. Hacıhamdioglu DO, Ozen S. Canakinumab induces remission in a patient with resistant familial Mediterranean fever. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51:1041.
159. Hashkes PJ, Spalding SJ, Giannini EH, Huang B, Park G, Barron KS, et al. Rilonacept (IL-1 TRAP) for treatment of colchicine resistant familial mediterranean fever (FMF): a randomized, multicenter double-blinded, alternating treatment trial. *Pediatric Rheumatology* 2011; 9(Suppl 1): O38.
160. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol.* 2010; 4: 230-241.
161. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28:369–378.
162. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(8):509-24.
163. Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression RNA. 2006; 12:1161-1167.
164. Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG. microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *Am J Pathol.* 2010; 176(3): 1058-1064.

165. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, et al. miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet.* 2015; 31(11): 613-626.
166. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(6): 457-467.
167. Erdal ME, Yılmaz GS. Mikrona Çalışmaları ve Psikiyatriye Yansıması, Türkiye Klinikleri-J Psychiatry - Special Topics. 2016; 9(1):16-24.
168. Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. MicroRNAs and cancer *The British Journal of Surgery.* 2007; 94: 23-30.
169. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 2005; 37(7): 766-770.
170. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 2008; 18(10): 505-516.
171. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world *Science.* 2001; 294: 797-799.
172. Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116: 281–297.
173. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(9): 2999-3004.
174. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10:126- 139.
175. Kurihara Y, Watanabe Y. From The Cover: Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *PNAS.* 2004; 101(34): 12753–12758.
176. Chen X. microRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5923-5931.
177. Sun Z, Shi K, Yang S, Liu J, Zhou Q, Wang G, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications. *Mol Cancer.* 2018; 17(1): 147.
178. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(24): 15524-15529.
179. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer *Cancer*

- Science. 2010; 101: 2309-2315.
180. Voorhoeve PM, Agami R. Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1775(2): 274-282.
 181. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 623-31.
 182. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*. 2004; 10(12), 1957-1966.
 183. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(17): 9779-9784.
 184. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004; 18(24), 3016-3027.
 185. Wu KJ. The role of miRNA biogenesis and DDX17 in tumorigenesis and cancer stemness. *Biomed J*. 2020; 43(2):107-114.
 186. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003; 9(3): 277-279.
 187. Dong Z, Han M, Fedoroff N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *PNAS*. 2008; 105(29): 9970–9975.
 188. Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*. 2006; 12: 206–212.
 189. Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X. HEN1 recognizes 21 – 24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2'OH of the 3'terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(2): 667-675.
 190. Voinnet O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*. 2009; 136: 669-687.
 191. Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *PNAS*. 2005; 102(10): 3691–3696.
 192. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005; 123(4): 631-

- 640.
193. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001; 293(5532): 1146-1150.
 194. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(24): 6249.
 195. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna-A Publication of the Rna Society*. 2004; 10: 185-1891.
 196. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*. 2006; 12(12): 580-587.
 197. Lee Y, Ahn C, Han J. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425: 415-419.
 198. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 259-269.
 199. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004; 303(5654): 95-98.
 200. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J*. 2002; 21: 5875-5885.
 201. Mustafa H, Ercan K, Aydın G. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*. 2015; 10(3): 211-218.
 202. Xie M, Zhang S, Yu B. microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(1): 87–99.
 203. Liu W, Meng J, Cui J, Luan Y. Characterization and Function of MicroRNAs in Plants. *Front Plant Sci*. 2017; 8: 2200.
 204. Baumberger N, Baulcombe DC. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *PNAS*. 2005; 102(33): 11928–11933.
 205. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 87: 3-14.
 206. Goel A, Boland R. Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2012;

- 143:1442-60.
207. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 857-866.
208. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res*. 2006; 66(15):7390-7394.
209. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003; 35(3): 215-217.
210. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2007; 39(3): 380-385.
211. Yu C, Chen WP, Wang XH. MicroRNA in osteoarthritis. *J Int Med Res*. 2011; 39(1): 1-9.
212. Melton C, Blelloch R. MicroRNA Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 695: 105-117.
213. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA. *RNA*. 2005; 11: 1753-1761.
214. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 2007; 23: 175–205.
215. Wada T, Toma T, Matsuda Y, Yachie A, Itami S, Taguchi YH, et al. Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol*. 2017; 27(6): 1040-1046.
216. Amarilyo G, Pillar N, Ben-Zvi I, Weissglas-Volkov D, Zalcman J, Harel L, et al. Analysis of microRNAs in familial Mediterranean fever. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0197829.
217. Hortu HO, Karaca E, Sozeri B, Gulez N, Makay B, Gunduz C, et al. Evaluation of the effects of miRNAs in familial Mediterranean fever. *Clin Rheumatol*. 2019; 38(3): 635-643.
218. Akkaya-Ulum YZ, Balci-Peynircioglu B, Karadag O, Eroglu FK, Kalyoncu U, Kiraz S, et al. Alteration of the microRNA expression profile in familial Mediterranean fever patients. *Clin Exp Rheumatol*. 2017; 108(6): 90-94.
219. Ma L, Deng X, Wu M, Zhang G, Huang J. Downregulation of miRNA-204 by LMP-1 enhances CDC42 activity and facilitates invasion of EBV-associated

- nasopharyngeal carcinoma cells. *FEBS Lett.* 2014; 588(9): 1562-1570.
220. Li K, Xyu Q, Liu X, Liu Q, Wang M. [Growth inhibition of human hepatocellular carcinoma by miRNA-204 via down-regulation of Bcl-2 and Sirt1 expression]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2015; 31(2): 168-172.
221. Beres NJ, Kiss Z, Sztupinszki Z, Lendvai G, Arato A, Sziksz E, et al. Altered mucosal expression of microRNAs in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis.* 2017; 49: 378-387.
222. Lai NS, Yu HC, Tung CH, Huang KY, Huang HB, Lu MC. The role of aberrant expression of T cell miRNAs affected by TNF-a in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2017; 19:261.
223. Demir F, Çebi AH, Kalyoncu M. Assessment of Circulating Microribonucleic Acids in Patients With Familial Mediterranean Fever. *Arch Rheumatol.* 2020; 35(1):52-59.
224. Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, et al. MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase γ pathway. *Rheumatology (Oxford).* 2018; 57(4): 718-726.
225. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 2008; 451(7182): 1125-9.
226. Taïbi F, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L. miR-223: An inflammatory oncomiR enters the cardiovascular field. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(7): 1001-1009.
227. Wu L, Li H, Jia CY, Cheng W, Yu M, Peng M, et al. MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation. *FEBS Lett.* 2012; 586(7): 1038-1043.
228. Wong QW, Lung RW, Law PT, Lai PB, Chan KY, To KF, et al. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology.* 2008 Jul;135(1):257-69.
229. Vickers KC, Landstreet SR, Levin MG, Shoucri BM, Toth CL, Taylor RC, et al. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111(40): 14518-14523.
230. Fulci V, Scappucci G, Sebastiani GD, Giannitti C, Franceschini D, Meloni F, et al. miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid

- arthritis. *Hum Immunol.* 2010; 71(2): 206-211.
231. Hsu TS, Mo ST, Hsu PN, Lai MZ. c-FLIP is a target of the E3 ligase deltex1 in gastric cancer. *Cell Death Dis.* 2018; 9(2): 135.
232. Walker LSK. EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis. *Immunol Lett.* 2017; 184: 43-50.
233. Chistyakov DA, Savost'anov KV, Turakulov RI, Nosikov VV. Genetic determinants of Graves disease. *Mol Genet Metab.* 2000; 71(1-2): 66-69.
234. Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA-4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005; 204: 102-115.
235. Ville S, Poirier N, Blancho G, Vanhove B. Co-Stimulatory Blockade of the CD28/CD80-86/CTLA-4 Balance in Transplantation: Impact on Memory T Cells? *Front Immunol.* 2015; 6: 411.
236. Taha Khalaf A, Song JQ, Gao TT, Yu XP, Lei TC. CTLA-4 gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Chinese population. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 167395.
237. Malhotra D, Linehan JL, Dileepan T, Lee YJ, Purtha WE, Lu JV, et al. Tolerance is established in polyclonal CD4(+) T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol.* 2016; 17(2): 187-195.
238. Burnett DL, Parish IA, Masle-Farquhar E, Brink R, Goodnow CC. Murine LRBA deficiency causes CTLA-4 deficiency in Tregs without progression to immune dysregulation. *Immunol Cell Biol.* 2017; 95(9): 775-788.
239. Harlin H, Hwang KW, Palucki DA, Kim O, Thompson CB, Boothby M, et al. CTLA-4 engagement regulates NF-kappaB activation in vivo. *Eur J Immunol.* 2002; 32(8): 2095-2104.
240. O'Day SJ, Hamid O, Urba WJ. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer.* 2007; 110(12): 2614-2627.
241. Grossman C, Kassel Y, Livneh A, Ben-Zvi I. Familial Mediterranean fever (FMF) phenotype in patients homozygous to the MEFV M694V mutation. *Eur J Med Genet.* 2019; 62(6): 103532.
242. Ece A, Cakmak E, Uluca U, Kelekci S, Yolbas I, Gunes A, et al. The mefv mutations and their clinical correlations in children with familial mediterranean fever in southeast Turkey. *Rheumatol Int* 2014; 34: 207-212.

243. Ait-Idir D, Djerdjouri B, Bouldjennet F, Taha RZ, El-Shanti H, Sari-Hamidou R, et al. The m694i/m694i genotype: A genetic risk factor of aa-amyloidosis in a group of algerian patients with familial mediterranean fever. *Eur J Med Genet* 2017; 60: 149-153.
244. Ozen S. Familial Mediterranean fever: revisiting an ancient disease. *Eur J Pediatr* 2003; 162(7/8): 449-54.
245. Seshadri S, Duncan MD, Hart JM, Gavrilin MA, Wewers MD. Pyrin levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1beta processing and release. *J Immunol.* 2007; 179(2): 1274-81.
246. Haghigat M, Derakhshan A, Karamifar H. Familial Mediterranean Fever. *Shiraz E-medical Journal* 2006; 7(2): 1-16.
247. Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahimi I, Taniguchi S, et al. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ.* 2006; 13(2): 236-249.
248. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell.* 2003; 11(3): 591-604.
249. Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ, et al. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(26): 9982-9987.
250. Hesker PR, Nguyen M, Kovarova M, Ting JP, Koller BH. Genetic loss of murine pyrin, the Familial Mediterranean Fever protein, increases interleukin-1 β levels. *PLoS One.* 2012; 7(11): e51105.
251. Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, et al. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology (Oxford).* 2001; 40(6): 662-667.
252. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun.* 2000; 1(3): 170-184.
253. Hadj Kacem H, Bellassoued M, Bougacha-Elleuch N, Abid M, Ayadi H. CTLA-4 gene polymorphisms in Tunisian patients with Graves' disease. *Clin Immunol.* 2001; 101(3): 361-365.

254. Aypar E, Ozen S, Okur H, Kutluk T, Besbas N, Bakkaloglu A. Th1 polarization in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol.* 2003; 30(9): 2011-2013.
255. Gunesacar R, Erken E, Dinkci S. Analysis of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) promoter -318C/T and +49A/G gene polymorphisms in Turkish patients with familial Mediterranean fever. *Cell Biochem Biophys.* 2013; 65(2): 181-186.
256. Saverino D, Brizzolara R, Simone R, Chiappori A, Milintenda-Floriani F, Pesce G, et al. Soluble CTLA-4 in autoimmune thyroid diseases: relationship with clinical status and possible role in the immune response dysregulation. *Clin Immunol.* 2007; 123(2): 190-198.
257. Simone R, Brizzolara R, Chiappori A, Milintenda-Floriani F, Natale C, Greco L, et al. A functional soluble form of CTLA-4 is present in the serum of celiac patients and correlates with mucosal injury. *Int Immunol.* 2009; 21(9): 1037-1045.
258. Willis MS, Townley-Tilson WH, Kang EY, Homeister JW, Patterson C. Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res.* 2010; 106(3): 463-478.
259. Leu CM, Hsu TS, Kuo YP, Lai MZ, Liu PC, Chen MH, et al. Deltex1 suppresses T cell function and is a biomarker for diagnosis and disease activity of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2019; 58(4): 719-728.
260. Celiksoy MH, Dogan C, Erturk B, Keskin E, Ada BS. The MEFV gene and its association with familial Mediterranean fever, severe atopy, and recurrent respiratory tract infections. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2020; 48(5): 430-440.
261. Álvarez-Errico D, Vento-Tormo R, Ballestar E. Genetic and Epigenetic Determinants in Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2017; 8: 318.
262. Cobb BS, Hertweck A, Smith J, O'Connor E, Graf D, Cook T, et al. A role for Dicer in immune regulation. *J Exp Med.* 2006; 203: 2519–2527.
263. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792(6): 497–505.
264. Latsoudis H, Mashreghi MF, Grün JR, Chang HD, Stuhlmüller B, Repa A, et al. Differential expression of miR-4520a associated with pyrin mutations in familial Mediterranean fever (FMF). *J Cell Physiol.* 2017; 232(6):1326–1336.
265. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007; 129; 147-161.
266. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung

- V. NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223. *J Immunol.* 2012; 189(8): 4175-4181.
267. Sonkoly E, Pivarski A. microRNAs in inflammation. *Int Rev Immunol* 2009; 28: 53561.
268. Wu XQ, Dai Y, Yang Y, Huang C, Meng XM, Wu BM, et al. Emerging role of microRNAs in regulating macrophage activation and polarization in immune response and inflammation. *Immunology.* 2016; 148(3): 237-248.



AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA MİKRORNA-204-3P, MİKRORNA-223-3P, DELTEX1, SİTOTOKSİK T-LENFOSİT İLE İLİŞKİLİ ANTİJEN GENİ-4`ÜN ÖNEMİ

ORJİNALLİK RAPORU

% **19**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **18**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **8**
YAYINLAR

% **8**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
3	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
5	9lib.net İnternet Kaynağı	%1
6	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	%1
7	www.jarem.org İnternet Kaynağı	%1
8	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1

acikerisim.kku.edu.tr