

T.C
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İzmir İli Kamu Hastaneleri Birliği Güney Genel Sekreterliği
Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Eğitim Sorumlusu: Uz.Dr Nuriye UZUNCAN

İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIKLARINDA
MEFV GENİ MUTASYON SIKLIĞI VE
KLİNİKLE İLİŞKİSİ

Dr. Sezen KOCAÖZ

UZMANLIK TEZİ

2014 - İZMİR

T.C
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İzmir İli Kamu Hastaneleri Birliği Güney Genel Sekreterliği
Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Eğitim Sorumlusu: Uz. Dr Nuriye UZUNCAN

İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIKLARINDA
MEFV GENİ MUTASYONU SIKLIĞI VE
KLİNİKLE İLİŞKİSİ

Dr. Sezen KOCAÖZ

Tez Danışmanı : Uzm.Dr. Derya GÜLEÇ

UZMANLIK TEZİ

2014 - İZMİR

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin ancak bir süresini birlikte geçirebildiğim için üzüldüğüm, çok kıymetli Hocam Sayın Uzm.Dr. Baysal KARACA' ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Eğitim Sorumlumuz, Hocam Sayın Uzm.Dr.Nuriye UZUNCAN'a ,

Gerek tez çalışmam boyunca, gerekse uzmanlık eğitimim süresince desteğini, hoşgörüsünü, dostluğunu hissettiğim, çalışkan ve üretken kişiliğini örnek aldığım Tez Danışmanım Sayın Uzm. Dr . Derya GÜLEÇ'e ,

Bu tezin ortaya çıkmasında klinik bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Sayın Uzm.Dr. Cem ÇEKİÇ'e ,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Başasistan Uzm.Dr. Sibel BİLGİLİye , Başasistan Doç.Dr. Giray BOZKAYA , Doç.Dr.Aydan ÇELEBİLER, Uzm.Dr. Ömür ERKIZAN, Uzm. Dr. Ünsal GÜNDOĞDU Uzm.Dr. İsmail YILMAZ'a,

Beraber çalışmaktan çok keyif aldığım, dostlarım, Asistan arkadaşlarım Dr.Yeter ŞİRİN, Dr. Özlem UĞURLU DEMİREZEN, Dr. Murat AKŞİT, Dr.Alperen Halil İHTİYAR ve Dr. Özge ESENLİK'e,

Başta Neslihan ERGÜDENGİL, Dilek ÇANKAYA ve Belma SELÇUK olmak üzere Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvar'ında çalışan tüm laboratuvar personeline,

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı sevgili kuzenim Özge KOÇAK' a,

Tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca gösterdikleri özverileri, destekleri ve sevgileri ile beni bugüne getiren aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.İnflamatuvar Barsak Hastalığı.....	4
2.1.1. Epidemiyoloji	4
2.1.2. Etyoloji	5
2.1.3.Patogenez.....	6
2.1.4. Klinik	9
2.1.5.Tanı.....	14
2.1.6.Tedavi	15
2.2.Ailesel Akdeniz Ateşi	16
2.2.1.Laboratuvar Bulguları.....	16
2.2.2.Tanı	17
2.2.3.Tedavi	18
2.2.4.Epidemiyoloji	18
2.3. MEFV Geni	19
2.3.1. Pyrin Proteini.....	25
2.3.2. İnflamazom	28
2.3.3. Pyrin Proteininin inflamasyondaki Yeri ve Bozulmuş Fonksiyonu ...	30
2.3.3.1. Pyrin'in Kaspaz-1 Tarafından Parçalanması ve NF-κB Aktivitesinin Artırılması	33
2.3.4. Otoinflamatuvar Hastalıklar ve İnflamazom kompleksi.....	35
2.3.5. MEFV Geni nin FMF Dışı Hastalıklarla İlişkisi	43
2.3.5.1. FMF ile ilişkili hastalıklar.....	43

2.3.5.2. FMF İle muhtemelen ilişkili hastalıklar.....	44
2.3.5.2.1. Behçet hastalığı	44
2.3.5.2.2. Romatoid Artrit	44
2.3.5.2.3. Multiple Skleroz.....	44
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	45
3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	45
3.2. Metod.....	45
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu	45
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	46
3.2.3. MEFV Ekzon 2 ve 10 PCR Protokolü.....	48
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	49
3.2.5. PCR Pürifikasyonu	50
3.2.6. DNA Dizi Analizi	50
3.2.7 İstatistiksel Değerlendirme	52
4. BULGULAR	53
4.1. Betimleyici İstatistikler	53
4.2. Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalarında MEFV Genindeki Mutasyon Sıklıklarının Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması.....	54
4.3. Tüm İnflamatuvar Barsak Hastalarında (Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalarında) Mutasyonların Klinik Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	61
4.4. MEFV Genindeki Mutasyonların Crohn Hastalığının Klinik Karakterine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	65
4.5. MEFV Genindeki Mutasyonlarının Ülseratif Kolit Hastalarının Klinik Özellikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	71
6. ÖZET.....	83

7.ABSTRACT	85
8.ÖZGEÇMİŞ	87
9. KAYNAKLAR.....	88



KISALTMALAR

AAA: Ailevi Akdeniz Ateşi

FMF: Familial Mediterranean Fever

MEFV: Mediterranean Fever Gene

AA: Amiloid A

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

İBH: İnflamatuvar Barsak Hastalıkları

ÜK: Ülseratif Kolit

CH: Crohn Hastalığı

MEFV: Ailevi Akdeniz ateşi geni

PCR: Polymerase Chain Reaction

NOD2: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2

CARD15: Caspase Recruitment Domains 15

NFκB: Nükleer Factor kappa-B

ASC: Apoptosis-associated Speck-like Protein

IκB-α: I kappa-B

ANCA: Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibodies

IgA: İmmünglobulin A

TLR: Toll Like Receptors

NOD: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain

IBD1: Inflammatory Bowel Disease 1

TGF-beta: Transforming Growth Factor

IF-γ: Interferon gama

IL: Interleukin

IL-6R: IL-6 Receptor

CRP: C Reactive Protein

CDAİ: Crohn's Disease Activity Index

ASCA: Anti-Saccharomyces Cerevisiae Antibodies

ESH: Eritrosit Sedimentasyon Hızı

PYD: Amino (N) ucu Pyrin domaini

DD: Death Domain

DED: Death Efektör Domain

CARD: Caspase Recruitment Domain

PRR: Pattern recognition receptors

DAMP: Damage-Associated Molecular Patterns

AIDs: Autoinflammatory Diseases

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Sistemik otoinflamatuvar hastalıklar yüksek titre otoantikör ve antijen spesifik T hücrelerini içermeyen, kendiliğinden oluşan bir inflamasyon sürecinde meydana gelen hastalıklar olarak tanımlanır. Bu kavram, 15 yıl kadar önce kalıtsal yüksek ateş sendromlarından olan FMF ve TNF reseptör-ilişkili periyodik sendromlarına neden olan genlerin keşfedilmesi ile ileri sürülmüştür. Bu durum, bu iki hastalığın, yeni ortaya çıkan bir inflamatuvar hastalık ailesi için prototip olabileceği ihtimalini ortaya atar (1).

İlerleyen zamanlarda moleküler temellerinin daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasından çok klinik sunumlarına dayanarak, otoinflamatuvar hastalıklar evrenine bazı yeni kategoriler eklendi –Gut, Hereditör Anjiyodermi gibi kompleman hastalıkları, Crohn ve Blau sendromu gibi granulomatoz hastalıklar, Behçet gibi vaskülitik sendromlar (2). Daha yakın zamanda başka hastalık sınıflarında otoinflamatuvar başlığı altına toplanmıştır - İdiyopatik Febril Sendromlar [Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis (SoJIA); erişkin Still hastalığı; aftöz stomatit, faranjit ve servikal lenfadenopati ile periodik ateş sendromları (PFAPA)] (3,4), Piyojenik Artrit, Piyoderma Gangrenosum ve akne gibi piyojenik hastalıklar (PAPA) (5) ve inflamatuvar kemik hastalıkları (6). Bu sistemik otoinflamatuvar hastalıklar kategorizasyonu otoinflamasyon ile ilişkili fenotip kapsamını genişletmekle kalmamış aynı zamanda otoinflamasyon hastalıklar kavramını genetik olarak kompleks hastalıklar dünyasına da genişletmiştir (1).

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı bozulmuş mukozal immün cevapla karakterize en yaygın görülen kronik inflamatuvar barsak hastalıklarıdır. Patogenezinin halen tam olarak bilinmemesine karşın hastalığın, çevresel, genetik ve immün faktörlerin, endojen ve eksojen tetikleyicilerin, bakteriyel floraların kompleks etkileşimi sonucu oluştuğu düşünülüyor (7). Gen ilişkili çalışmaların artışı immunopatogenezin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. İnflamatuvar barsak hastalıklarının patogenezinde genetik komponent önemli bir role sahiptir. 2001 yılında NOD2 /CARD15 (nucleotide oligomerization Domain 2 /caspase recruitment domain 15), İnflamatuvar Barsak Hastalıkları (İBH) hastalarında tespit edilen ilk gen

olmuştur. 16. kromozomun kısa koluna yerleşmiş olan bu gen, NOD2/CARD 15 proteinini kodlamaktadır. Bu gen apoptozis ve doğuştan gelen immün cevapta rolü olan NFκB transkripsiyon faktörünü aktive eden proteinlerin sentezinden sorumludur. Crohn hastalarının üçte biri NOD2/CARD15 geninde mutasyon taşımaktadır (8,9). Rollerini daha az karakterize edilmiş olsa da 30'un üstünde İBH'ye yatkınlık geliştiren gen bulunmuştur (10,14). NOD 2 halen İBH'na yatkınlıkta kritik gendir. Buna karşılık İBH patogenezinde NOD2 katkısı büyük bölgesel değişkenlik gösterir. Türkiye'den bazı çalışmalarda Türk hastalarında NOD2'nin önemli rolününün olmadığı vurgulanmıştır (15,16). Crohn Hastalığı (CH) ile ilgili üç büyük genom-çaplı ilişki çalışmaları (GWAS) hakkındaki yeni bir meta-analize göre, CH ile köklü/yerleşik ilişkiler, CH'da görülen genetik varyasyonun sadece % 20'sini teşkil etmekte, bu da daha başka genetik katkıların hala keşfedilebileceğine işaret etmektedir (17).

FMF, rekürren episodlar, ateş ve serozal inflamasyonla karakterize, otozomal resesif geçişli bir hastalıktır ve otoinflamatuvar hastalıkların bir prototipidir (18,19). Türkiye'de FMF'in tahmin edilen prevalansı 1/1073, taşıyıcılık oranı 1/5 dir. İBH gibi diğer bazı inflamatuvar hastalıkların FMF'de prevalansının arttığı bildirilmiştir (19,20). FMF'den sorumlu 16p13'de lokalize olan MEFV geni (Mediterranean Fever Gene), interlekin 1 (IL-1) ve NF-κB ilgili inflamasyonla ilişkili olduğu düşünülen, pyrin adı verilen bir proteini kodlamaktadır (21,22). Pyrin fonksiyonunu CARD ve PYD bölgesi aracılığı ile gösterir. MEFV genindeki mutasyonlar IL-1b yolağı aktivasyonu ile ilişkili, şiddetli inflamasyon atakları ile sonuçlanan doğuştan gelen Ailevi Akdeniz Ateşi'nden sorumludur (23).

Vahşi tip Pyrin'in tam olarak etkileri henüz bilinmese de birçok çalışmada antiinflamatuvar etkilerinin olduğu ve nötrofil aktivitesini regüle ettiği gösterilmiştir (24,25). FMF'den sorumlu pyrin ve İBH'dan sorumlu NOD2/CARD15 gen ürünü yapı olarak benzerdir; CARD bölgesi içerirler ve aynı protein ailesindedirler (death domain süperfamily). Her ikisi de apoptozis, sitokin salınımı ve inflamasyon regülasyonunda önemli rol oynarlar. MEFV genindeki mutasyonlar ve polimorfizmler sadece bir allelde olsa bile subklinik inflamasyon tablosuna neden olabilirler (26,27).

İBH ve sistemik otoinflamatuvar hastalıkların prototipi olan FMF birlikteliği ile ilgili çalışmalar, İBH ve FMF arasında bir ilişki olduğunu ve MEFV mutasyonlarının İBH üzerinde modifiye edici bir etkisi olduğunu düşündürmektedir (28-33). İBH ve FMF hastalığı, karın ağrısı, diare, artralji, artrit ve ateş gibi ortak klinik özellikleri gösterirler (34). Her iki hastalık da, inflamasyon bölgesinde nötrofil infiltrasyonunun olduğu, apoptozis regülasyonunun bozulduğu ve kliniklerinde remisyon ve relapsların görüldüğü periodik inflamatuvar hastalıklardır (32).

Sistemik otoinflamatuvar hastalık ailesi kavramı ve doğal bağışıklık biyolojisinin önemli yakınlaşması ile ilgili çalışmaların varlığı, pyrin ve NOD2/CARD15 proteinlerinin yapısal ve inflamasyon kaskadındaki işlevsel ortaklık iddiası ve klinik şiddeti kendi içinde hastadan hastaya değişebilen inflamatuvar barsak hastalarının (Crohn ve Ülseratif Kolit), klinik değişkenliğine, inflamasyon kontrolündeki önemli rolü nedeniyle, pyrin proteinini kodlayan MEFV genindeki mutasyonların sebep olabileceği fikri, bizi bu incelemeyi planlamaya itti.

Çalışmadaki amacımız, Crohn ve Ülseratif Kolit hastalarında diğer bir otoinflamatuvar hastalık olan FMF'den sorumlu MEFV geninin mutasyon sıklığını araştırmak ve klinik seyir ile ilişkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, inflamatuvar barsak hastalığı olarak adlandırılan, gastrointestinal sistemin kronik inflamatuvar hastalıklarıdır. Etyolojide çevresel faktörler, infeksiyöz ajanlar, genetik ve immün bozukluk gösterilse de etyopatogenez kesin olarak bilinmemektedir (35). İBH'nın patogenezinde genetik duyarlı kişilerde çeşitli çevresel faktörler ya da antijenlere karşı abartılı bir immün yanıt varlığı ileri sürülmektedir (36).

2.1.1. Epidemiyoloji

Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika insidans ve prevelansın en yüksek olduğu yerlerdir. Norveç'te yıllık insidans CH için 5.8/100000, ÜK için 12.8/100000 iken, bu oran Kanada'da 14.3/100000 ve 14.6/100000 olarak bildirilmiştir (37,38). Türkiye için oranlar, İBH derneği veri tabanına göre ÜK için 4.1/100000 ve CH için 2.6/100000'dir (39). Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının insidans ve prevalansı coğrafi bölgelere göre büyük farklılıklar gösterdiği gibi, etnik grup ve ırka göre de varyasyonlar gösterir (40). Her iki hastalık da coğrafi bölge olarak Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da etnik köken olarak Yahudilerde, ırk olarak beyazlarda daha fazla görülmektedir (41,42,43). İBH her ırkta görülürse de, Yahudilerde insidans diğer ırklara göre çok yüksektir. İsrail'de Asya ve Afrika kökenli Yahudilerde bu insidans, Avrupa ve Amerika kökenli Yahudilere kıyasla çok daha düşüktür (44). Popülasyonların düşük riskli bölgelerden yüksek riskli bölgelere göç etmesi sonucu hastalığın insidansı artmıştır (45). Bu da etnik ve ırksal farklılığın genetik farklılıktan daha çok yaşam şekline ve çevresel etkiye bağlı olduğunu gösterir. Ancak Aşkenaz Yahudilerinde değişik zamanlarda ve farklı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalarda bu popülasyonun İBH için artan risk göstermesi bu etnik grupta genetik faktörlerin daha büyük bir role sahip olduğu fikrini vermiştir (46).

Her iki hastalık da çoğunlukla genç yaş grubunun hastalığıdır. En çok 20-29 yaşları arasında ortaya çıkarlar. İBH, 60-80 yaşları arasında ikinci bir pik yapar. Her iki cinsiyet için dağılım kabaca eşit oranlardadır (47).

İBH ekonomik durumu ve eğitim düzeyi yüksek kişilerde ve şehirde yaşayan insanlarda daha sık görülmektedir (48,49).

2.1.2. Etiyoloji

İBH patogenezinde genetik faktörlerin önemli olduğunu gösteren bulgular mevcuttur. Hastaların birinci derece akrabalarında CH gelişme riski 35 kat, ÜK riski 15 kat artmıştır (35,50). Genetik faktörlerin etkisi CH’nda ÜK’e göre daha fazladır (51). Monozigotik ikizlerde hastalık rastlanma oranı dizigotik ikizlere göre daha fazladır (35,50). Akrabalar arasında hastalığın tipi ve davranışı büyük oranda benzerlik gösterir (52). Crohn hastaları ile yapılan çalışmalarda 16. kromozomda genetik geçiş lokusu bulunmuştur. Buradaki sorumlu genin stoplazmik bir protein olan NOD2 veya CARD 15’i kodlayan gen olduğu saptanmıştır. NOD 2 mutasyonu için homozigotlarda CH riski 20 kat artmaktadır. Fakat Crohn’luların **sadece** %20’sinde NOD2 mutasyonu saptanmıştır. Bu da CH’nda başka genlerde de mutasyonlar olabileceğini göstermektedir (53). HLA-DR2 ÜK’le, HLA-DR1/DQw5 ve HLA-DRB30301 CH ile ilişkili görünmektedir. ÜK hastalarının %70’inde ANCA pozitif saptanır. Crohn hastalarında bu oran %50’den azdır. ANCA’nın İBH patogenezindeki rolü bilinmemektedir (35,50). Çevresel risk faktörleri arasında sigara içmeyenlerde ülseratif kolit gelişme riski içenlere göre daha fazladır. Sigarayı bırakmak ÜK’yi provake edebilir. Buna karşın CH sigara içenlerde daha çok görülür. Sigara içen Crohn hastalarında hastalık daha şiddetli seyreder ve cerrahi sonrası nüks fazladır (55).

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç ve antibiyotik kullanımı ülseratif kolitte alevlenmeye neden olabilir. Oral kontraseptif kullanımı ile İBH arasındaki ilişki araştırılmış fakat güçlü bir bağ bulunamamıştır (55).

Çalışmalarda appendektominin ÜK’ten koruyucu olduğu gösterilmiştir. ÜK’te, lenfoid dokudan zengin olan appendixte B lenfositler, kolonosit hücre

çatısında bulunan tropomiyosine karşı antikorlar geliştirir. Appendektomi bu durumu engeller (55).

Diyet antijenlerinin İBH'da rolü olduğunu düşündüren çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu hastalarda gıda antijenlerine karşı gelişmiş antikorlar bulunmuştur. Balık, kahve, margarin, rafine şeker ile ilişki araştırılmış ve rafine şeker ile özellikle CH arasında ilişki saptanmıştır (56).

Hastalığın gelişmiş ülkelerde, kentte yaşayanlarda ve sosyoekonomik düzeyi yüksek kişilerde daha sık görülmesi hijyenin etyolojide rol oynadığını düşündürmektedir. Aşırı hijyen, hastalık için risk faktörü gibi görünmektedir.

M. tuberculosis, Lysteria monositogenes ve kızamık virüsü etken olarak öne sürülmüş fakat kanıtlanamamıştır.

Perinatal-çocukluk dönemi faktörleri arasında anne sütünün İBH'dan koruyucu olduğu, CH'da bu etkinin daha belirgin olduğu iddia edilmektedir (57). Hastalık patogenezi için bugüne kadar birçok hipotez ortaya atılmıştır. Bugün için geçerli olan hipotezlerden birisi; genetik bir yatkınlık altında çeşitli faktörlerin (mikrobiyal bir antijen, otoantijen, sigara gibi) etkisi ile gastrointestinal sistemde oluşan anormal inflamatuvar yanıtıdır (35). Normal şartlarda koruma amaçlı olan mukozal immun sistemin oluşturduğu bu inflamatuvar yanıt, mekanizması netleşmemiş olan normal fizyolojik bir baskılama sistemi ile kontrol edilmektedir. Diğer yandan genetik yatkınlığa sahip olan kişilerde inflamasyon baskılanamamakta ve doku harabiyeti gerçekleşmektedir. Bu da inflamasyon sisteminde rol oynayan herhangi bir gendeki mutasyon ve polimorfizmlerin kişilerde inflamatuvar barsak hastalığa yatkınlığı arttırabileceğini gösterir (58).

2.1.3. Patogenez

Barsak epitel hücreleri, antijenleri immün sisteme ulaştırmayı engelleyen ilk hücresel basamaktır. Epitel hücreleri üzerinde salgısal IgA, glikoproteinler, fosfolipidlerin oluşturduğu bariyer örtü sayesinde mikroorganizmalar hücre membranlarına bağlanamaz ve mukoza kimyasal hasardan korunur (59). İnce barsaktaki özelleşmiş Paneth hücreleri, bakterilerin membranında lizise neden olan

defansin grubu antimikrobiyal proteinleri sentezler (60). ÜK ve CH'da mukozada geçirgenlik artmıştır ve bu epitelden immün alana geçen antijenler inflamatuvar süreci başlatır. Bu geçirgenlik artışı klinik bulgular ortaya çıkmadan önce de saptanabilir (61).

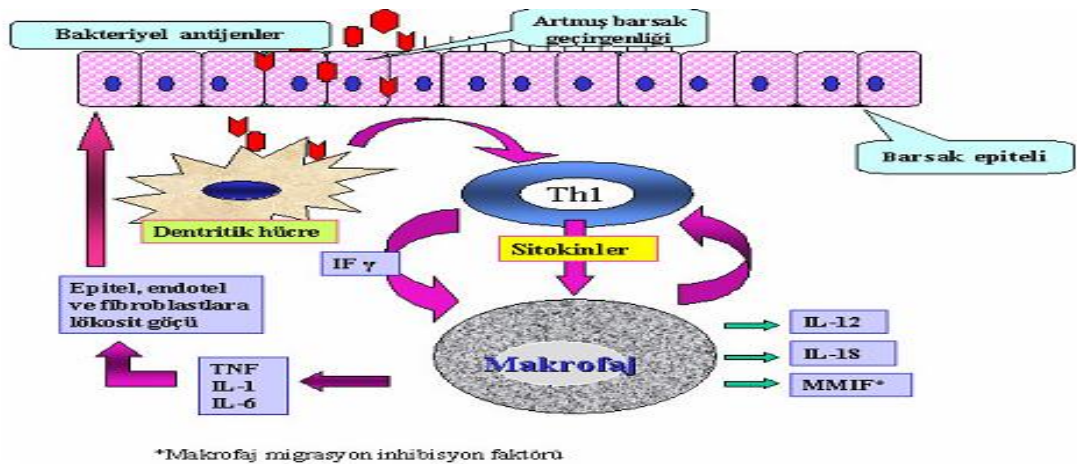
Epitel hücreleri, natural killer (NK) hücreler, makrofajlar, fibroblastlar doğal immün yanıtta rol alır. Doğal immün yanıt, antijen sunan hücreler olan dentritik hücreler ve makrofajlar tarafından hızla başlatılır (59). Gastrointestinal epitel hücrelerinde, dentritik hücrelerde ve lamina propriadaki immün hücrelerde eksprese olan ve TLR (toll like receptors) adı verilen reseptörler uyarıldıklarında doğal ve edinsel immün yanıtı uyarır. TLR uyarıldığında NFkB aktive olur ve inflamatuvar sitokin salınımı başlar (61,62). İBH hastalarında, intestinal epitelde TLR-9 artmıştır ve reseptör bakteri DNA'sı ile uyarıldığında nötrofiller için kemotaktik olan IL-8 salınımı olur (61). İntestinal epitelyum hücrelerinde var olan diğer reseptör ailesine NOD (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain) adı verilir. NOD1 ve NOD2 reseptörleri, gram pozitif ve negatif bakterilere duyarlıdır. Crohn hastalarında CARD15 gen mutasyonu ile bu proteinler T helper 1 (Th1) yönünde inflamasyona neden olurlar (62,63). 16. kromozomun perisentromik bölgesinde IBD1 lokusunda İBH'den sorumlu bir gen tanımlanmıştır. Bu genin makrofajlarda NOD2 ya da CARD15 olarak adlandırılan bir sitoplazmik proteini kodladığı bulunmuştur. Bu protein makrofajların üzerinde eksprese olmaktadır ve bakteriyel lipopolisakkaridler için sitozolik bir taşıyıcı reseptör gibi davranır. Hücre içi endotoksinlere bağlanarak nükleer faktör kappa-B'nin aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca makrofajların apoptozisini arttırmaktadır ve inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine yol açmaktadır. NOD2'deki mutasyonlar Crohn hastalarının % 15-30'unda görülür (9,64) .

Edinsel immün yanıtta ise CD4 T hücreleri spesifik immün cevabı düzenler ve Th1 ve Th2 olmak üzere ikiye ayrılır. Th1 hücreleri hücresel immün cevabı düzenler ve IL-2, interferon gama (IF-gama) salgırlar. Th2 hücreleri ise humoral cevabı düzenler ve IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve TGF-beta salgırlar. CH'da mukozada Th1 lenfositler esas olarak birikirken ÜK'de Th2 hücreler baskındır (65,66).

CH'da mukozal bariyerin bozulması ile antijenler epiteli geçer ve dentritik hücreler gibi antijen sunan hücreleri aktive ederler. Aktive antijen sunan hücreler, Th1 hücreleri aktifleştirir. Th1 hücrelerden salgılanan IF-gamma makrofajları uyarak inflamatuvar sitokinler olan TNF-alfa, IL-1, IL-6 salgılatır. Uyarılan makrofaj, Th1 hücreleri uyaran sitokinleri salgılayarak inflamasyonun sürekliliğine neden olur. ÜK'de, T hücre cevabı Th2 baskındır. ÜK'li hastalarda kolonik rezeksiyondan elde edilen dokulardan izole edilen lamina propriadaki mononükleer hücrelerde Th2 sitokinleri olan IL-13 ve IL-15'in arttığını gösterilmiştir. Özellikle de NK ve T hücre aracılı immünite görülür (67).



Şekil 2.1: ÜK'de immünpatogenez (68)



Şekil 2.2: CH'da immünpatogenez (68)

Bir proinflamatuvar sitokin olan IL-6'nın, her iki İBH tablosu için de patogeneizde merkezi rol oynadığına dair giderek artan kanıtlar vardır. CH'nda IL-6 düzeyi ile inflamatuvar aktivite koreledir. Steroid ile remisyon sağlanmış Crohn Hastalarında yüksek IL-6 düzeyleri relaps için belirleyicidir (69). ÜK'te de benzer sonuçlar vardır. ÜK'te inflamatuvar aktivite ile lokal IL-6 üretimi arasında pozitif korelasyon vardır (70). Her iki hastalıkta da serum IL-6R düzeyleri, aktif hastalıkta inaktif hastalığa göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (71). IL-6, karaciğerden CRP gibi akut faz reaktanlarının üretimini indükleyen ana sitokindir (72). Artmış mukozal geçirgenliğe bağlı olarak, intestinal bakteriyel floranın antijenleri mukozal immün sistemi sürekli aktive eder. Makrofaj migrasyon inhibitör faktör aracılığıyla intestinal makrofajlar ve CD4+ T hücrelerden IL-6 ve IL-6R üretimi artar (73).

ÜK ve CH'da akut inflamasyonda histolojik olarak mukoza ve submukozada nötrofil infiltrasyonu vardır. Nötrofillerin akışı, dolaşan nötrofillerden salınan adezyon moleküllerinin ekspresyonu veya vasküler endotel hücrelerinin nötrofilleri bağlaması ile gerçekleşir. Adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve nötrofillerin migrasyonu platelet aktive edici faktör ve lökotrien B4 tarafından regüle edilir. İnflame bağırsaktaki nötrofil aktivasyonu, granüler proteazlar ve superoksidler ve diğer reaktif oksijen türlerinin üretimiyle sonuçlanır. Aktive nötrofillerden üretilen bu ürünler, İBH'da epitel hücrelerinin harabiyetinde rol oynar. Kortikosteroidler, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve nötrofillerin migrasyonunu önler. 5-Anti Salisilik Asit antioksidan ve doku hasarını önleyici etki gösterir. Ayrıca kortikosteroidler ve sülfosalazin prostoglandin ve lökotrienlerin invivo ve invitro sentezini bloke ederler (74).

2.1.4. Klinik

Ülseratif Kolit remisyon ve nüksler ile seyreder. Hastalık rektum mukozasından başlayarak proksimal kolon mukozasına doğru, arada sağlam mukoza bırakmaksızın devam eder. Rektum tutulumu daima mevcuttur. Sadece rektum tutulumuna 'ülseratif proktit', splenik fleksura distalindeki mukozanın tutulumuna 'sol kolit', splenik fleksuranın daha proksimalinin tutulumuna 'yaygın kolit' ve hepatik

fleksura proksimalinin de tutulumuna ‘pankolit’ adı verilir. Klinik olarak kanlı dışkılama, diyare, kilo kaybı ve karın ağrısı görülür (75). Semptomlar ve fizik muayene bulguları kolitin şiddeti ve tutulumu ile ilişkilidir. Şiddetli hastalıkta dehidratasyon, ateş görülür. Kan kaybına bağlı halsizlik ve anemik görünüm olur. Extraintestinal tutulumda iritis, üveit, eritema nodosum görülebilir. Klinik şiddetin belirlenmesi için Truelove-Witts kriterleri kullanılır (76).

Tablo 2.1: Truelove-Witts sınıflaması

	Ağır	Orta	Hafif
Dışkılama	İshal günde 6’dan fazla, kanlı dışkılama	4-6 kez	Günde 4’den daha az dışkılama, çok az miktarda kan içerebilir
Ateş	>37.5°C		Yok
Taşikardi	Dakikada 90’dan fazla nabız		Yok
Anemi	Hb 7.5 gr/dl’den az		Hafif derecede
Sedimantasyon Hızı	>30mm/saat		<30mm/saat

Sınırlı hastalığı olanlarda Truelove-Witts kriterleri yetersiz kalmaktadır. Ayrıca bu sınıflamada endoskopik bulgular yoktur. Bu kısıtlamalar ‘ülseratif kolit hastalık aktivite indexi’ kullanılarak ortadan kaldırılabilir. Bu sınıflamada skor 0-12 arasındadır ve 0-2 puan remisyon, 10 üstü puan şiddetli hastalık olarak kabul edilir (76).

Tablo 2.2: ÜK Hastalık İndeksi

Skor		Kriter
Dışkı Sayısı	0	Normal
	1	Normale göre günde 1-2 dışkılama fazla
	2	Normale göre günde 3-4 dışkılama fazla
	3	Normale göre günde 5 ve daha fazla dışkılama
Rektal Kanama	0	Yok
	1	Çizgi tarzında kan
	2	Belirgin kanlı
	3	Bol kanlı
Mukozanın Görünümü	0	Normal
	1	Hafif friabl
	2	Orta derecede friabl
	3	Eksudasyon, spontan kanama
Hekimin Global Değerlendirmesi	0	Normal
	1	Hafif
	2	Orta
	3	Şiddetli

İlk ataktan sonra hastaların %40-65'i kronik intermittan hastalık formunda devam eder. Bu form relapslar ve remisyonlar ile seyreder. Hastaların %5-10'unda kronik

devamlı hastalık izlenir. %10 hastada ise ilk atak kolektomi gerektirecek kadar şiddetlidir (77).

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, antibiyotikler, sigara içiminin bırakılması, araya giren enfeksiyonlar ve tedaviye uyumsuzluk relapslara neden olabilir (76).

Perforasyon, striktür, toksik megakolon, kanama ve malignite gelişimi ülseratif kolitin lokal komplikasyonlarıdır (76).

Chron Hastalığı ise tüm gastrointestinal sistemin ve barsak dışı organların tutulumu ile karakterizedir. Yerleşim yerine göre ileoçekal, ince barsak, kalın barsak ve diğer tutulumlar olarak sınıflanır. Klinik davranışa göre ise inflamatuvar ve fibrostenotik ve penetran hastalık olmak üzere 3 gruba ayrılır.

İleoçekal bölge %40 tutulum oranı ile başlangıçtaki en sık tutulum yeridir. Semptomlar ishal ve karın ağrısıdır. Akut apandisit taklit eden kliniği nedeni ile appendektomi sonrası tanı konulabilir. Fibrostenotik hastalıkta tekrarlayan ince barsak obstrüksiyonları gelişir (36).

Sağ alt kadranda inflamatuvar kitle palpe edilebilir. Bu kitle, inflame barsak, mezenter ve büyümüş lenf nodlarına bağlıdır. Bu bölgenin ciddi inflamasyonu duvar kalınlaşmasına, mikroperforasyonlarla fissüre ve komşu barsak, cilt, mesane ya da mezenterdeki bir apse ile fistülizasyona neden olabilir (78).

İnce barsağa sınırlı hastalık %20 oranında görülür. Sindirim ve emilim yüzeyinin kaybı malabsorpsiyon ve steatoreye neden olur. Hipoalbuminemi, hipokalsemi, nefrolitiasis, koagulopati gelişebilir (78).

Osteopeni, B12 malabsorpsiyonuna bağlı megaloblastik anemi, niasin eksikliğine bağlı pellegra görülebilir (79,80).

Kolon tutulum oranı %20-25'dir. İshal, kanlı dışkılama, karın ağrısı, ateş halsizlik görülür (78). Perianal hastalık ya da obstrüksiyonlar cerrahi gerektirir (81).

Diğer organ tutulumları daha az oranda olmakla birlikte özofagus, mide, duodenum tutulabilir (78). Kolestatik karaciğer hastalığı, akut pankreatit, oral ülserler, episklerit, eritema nodosum gelişebilir (78).

Crohn hastalığında klinik aktiviteyi belirlemek için CDAİ (Crohn's Disease Activity Index) kullanılır. CDAİ belirlenirken hastanın bir hafta içindeki toplam dışkılama sayısı, karın ağrısı, genel iyilik hali, ekstra-intestinal belirtiler, lomotil ihtiyacı, batında anormal kitle varlığı, hematokrit ve kilo kaybı gibi parametrelerden yararlanır. CDAİ değerinin 150 altında olması remisyonu, 150 üstünde olması aktif hastalığı gösterir (83).

İnflamatuvar barsak hastalıklarının klinik sınıflaması Viyana ve Montreal sınıflamalarıyla düzenlenmiştir (84).

Tablo 2.3: Crohn Hastalığı Viyana ve Montreal sınıflamaları

	Viyana		Montreal	
Tanı sırasındaki yaş	A ₁	40 Yaş altı	A ₁	16 yaş altı
	A ₂	40 Yaş üstü	A ₂	17 ve 40 yaş arası
			A ₃	40 Yaş üstü
Lokasyon	L ₁	İlial	L ₁	İlial
	L ₂	Kolonik	L ₂	Kolonik
	L ₃	İleokolonik	L ₃	İleokolonik
	L ₄	Üst	L ₄	İzole üst hastalık*
Davranış	B ₁	Non-striktür, non-penetratif	B ₁	Non-striktür, non-penetratif
	B ₂	Striktüratif	B ₂	Striktüratif
	B ₃	Penetran	B ₃	Penetran
			P	Modifiye hastalık [†] perianal

*L4:Üst gastrointestinal hastalık varlığında L₁-L₃ 'e eklenerek modifiye edilir.

P[†]: Aynı zamanda perianal hastalık varlığında B₁-B₃'e eklenir.

Tablo 2.4: ÜK Montreal Klasifikasyonu

Derece		Anatomi
E1	Ülseratif proktit	Tutulum rektuma sınırlı (inflamasyonun proximali rektosigmoid birleşmenin distalidir)
E2	Sol kenar ÜK (distal ÜK)	Tutulum distal kolorektumun bir kısmı ile splenik flexura arası
E3	Yaygın ÜK (pankolit)	Tutulum splenik flexuranın proximaline kadar uzanır

2.1.5 Tanı:

İBH tanısı klinik değerlendirme ve hematolojik, endoskopik, histolojik ya da görüntüleme bazlı araştırmaların sonucu ile konur (85).

Dışkı direkt bakısında taze eritrositler ve lökositler saptanır. Rutin dışkı kültürü, Salmonella ve Shigella için kültür ve gerek duyulursa Clostridium difficile, Yersinia, Campylobacter için kültür yapılmalıdır. Lökositoz ve trombositoz aktif hastalıkta görülebilir. Barsaktan protein kaybına bağlı olarak akut dönemde albumin düzeyi düşük saptanabilir. ESR, ÜK'li hastalarda hastalık aktivitesi için değerli bir gösterge iken CH'da aktivite ile her zaman uyumlu olmayabilir. CRP, İBH'da artan bir akut faz reaktanıdır. Tedaviye yanıt veren olgularda düzeyinde anlamlı azalma olur (86).

CRP karaciğerden, IL-6, TNF-alfa ve IL-1 beta stimülasyonu ile üretilir. CRP, bakteriyal komponentler ve apoptozis sırasında üretilen nükleer materyal için opsonin görevi görür. Fekal kalprotektin, alfa-1 antitripsin ve laktoferrin fekal permeabilite markırları olarak kullanılabilir (87).

IL-6, IL-2, TNF-alfa seviyeleri ile aktivasyon arasında ilişki bildirilmiştir. Özellikle ÜK'de p-ANCA ve CH'da ASCA pozitif saptanabilir (86).

2.1.6 Tedavi

Aminosalisilatlar (sistemik ve topikal), antibiyotikler, sistemik steroidler, lokal steroidler, immünmodülatörler (azatiyopürin ve 6-merkaptopürin), metotreksat, siklosporin, biyolojik ajanlar (infliximab, adalimumab), mikofenolat mofetil İBH tedavisinde kullanılabilecek ajanlardır. Tedavi, hastalığın tutulum yeri, hastalık şiddeti, hastalık davranışı, barsak dışı tutulumlar ve ilaç yan etkilerine göre planlanmalıdır (88).

Aminosalisilatlar, ÜK'de remisyon indüksiyonu ve idame için kullanılırken, CH'da kolonik tutulumda kullanılabilirler. İnce barsak tutulumu olan CH'da pH bağımlı salınlı meselazin kullanılabilir (88). Aminosalisilatlar, siklooksijenazı, B lenfositleri ve birkaç sitokini inhibe ederek anti-inflamatuvar etki gösterirler (89). Antibiyotikler: metronidazol, siprofloksasin ve son zamanlarda rifaksimisin aktif CH'nın tedavisinde kullanılabilmektedir. Antibiyotikler özellikle perianal hastalık tedavisinde daha etkili olarak kullanılırlar. Sistemik ve sistemik olmayan steroidler aktif ÜK ve CH'da kullanılabilen ajanlardır. Sistemik olmayan steroid olan budezonid, hafif-orta şiddetli ileal hastalık ve proksimal kolon tutulumu olan hastalarda remisyon indüksiyonu için etkili ve güvenilir bir ajandır. Distal aktif ülseratif kolitte lokal formları kullanılabilir (88).

Azatiyopürin ve 6-merkaptopürin, hem ÜK hem de CH'da steroid azaltıcı tedavi olarak ve remisyonda kullanılırlar. Siklosporin ve takrolimus: şiddetli ya da refrakter ÜK'de etkili olabilir (88). Biyolojik ajanlardan infliximab her iki hastalıkta, adalimumab sadece CH'da kullanılan anti-TNF ajandır. Anti-TNF ajanlar orta-şiddetli ülseratif kolit ve CH'da, eşlik eden tedavilerden bağımsız olarak etkili olabilir. Aynı zamanda fistülizan CH'da da etkilidir.

2.2. Ailesel Akdeniz Ateşi

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) veya Familial Mediterranean Fever (FMF), ataklar halinde gelen ateş ve ona eşlik eden seröz zarların inflamasyonu, peritonit, artrit, pleurit ve erizipel benzeri rushla ile karakterize otozomal resesif geçişli hereditör, otoinflamatuvar (90) bir hastalıktır (91,92,93).

Klinik tablo kendini sınırlayan tekrarlayıcı karakterde ateş, karın ağrısı, göğüs ağrısı, artrit/artralji ve erizipel benzeri deri lezyonu semptom ve bulgulardan oluşur (1). AAA hastalarının yaklaşık %90'ında klinik bulgular 20 yaşından önce ortaya çıkar (93,94). Ataklar genellikle geç çocukluk, adolesan dönemde ortaya çıkmaktadır. %60-70 olguda semptomlar ilk 10 yaşta, %80-90 olguda 20 yaştan önce görülmektedir. Ortalama başlangıç yaşı 4,5 olarak saptanmıştır (95,96). Hastalığın en korkulan yanı böbrek yetmezliğine neden olan amiloidoz ile komplike olmasıdır (97,98).

2.2.1 Laboratuvar Bulguları

AAA için spesifik bir laboratuvar testi yoktur. Ataklar esnasında CRP, serum amiloid A, fibrinojen, beta-2 mikroglobulin, ESH artışı ve nötrofil hakimiyeti olan lökositöz görülebilmektedir (99,100,101,102). Gilmore ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CRP artışı, diğer akut faz rektanlarına göre AAA ataklarında daha anlamlı bir gösterge olarak kabul edilmektedir. SAA, tam kandaki lökosit sayısı, seruloplazmin, haptoglobulin de belirgin yükselme gösterir. Atak sonrası dönemde yine aynı testlerde hastaların çoğunda normale dönme olmakla birlikte subklinik inflamasyonun devam ettiği vakalar da vardır (103). Ataklar sırasında gecici albuminüri ve hematürinin yanısıra serumda IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , eriyebilir IL-2 reseptör (sIL-2R) düzeylerinin de atak dönemlerinde arttığı ileri sürülmüştür (104,105). Tüm bu parametrelerin akut ataklar arasındaki dönemde normal olduğunun bildirilmesine karşın son zamanlarda SAA'nın subklinik inflamasyonu saptamada en iyi gösterge olduğu sonucuna varılmıştır (104,106).

2.2.2. Tanı

AAA hastalığında tanı klinik bulgular, aile öyküsü, diğer hereditör periyodik ateş sendromlarının dışlanması ve kolşisin tedavisine oluşan yanıtla göre konulabilir. Bu amaçla Tel-Hashomer ve Livneh ve arkadaşlarının önerdiği AAA tanı kriterleri kullanılabilir (107,108) .

Literatürde en çok kullanılan tanı kriterleri Tel-Hashomer tanı kriterleridir (tablo 2-5).

Tablo 2.5: Tel-Hashomer tanı kriterleri (107).

Major Kriterler	1.Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları
	2.Predispoze hastalık olmadan AA tipi amiloidoz olması
	3.Kolşisin tedavisine iyi yanıt
Minör Kriterler	1.Tekrarlayan ateş atakları
	2.Erizipel benzeri eritemin varlığı
	3.Birinci derece akrabalarda AAA öyküsü
Kesin Tanı	2 Majör veya 1 Majör ve 2 Minör Kriter
Muhtemel Kriter	1 Majör ve 1 Minör Kriter

Tipik klinik tablo ile başvuran hastalarda genetik çalışma yapılması tanı için gerekli değildir. Tanısal problem daha çok atipik bulgularla gelen hastalarda olmaktadır. Bu durumda genetik analiz tanıya yardımcı olabilmektedir (109). Nedeni bilinmeyen ateşli olgularda ya da etiyolojisi belirlenememiş nefrotik sendromlu olgularda AAA genetik analizi önerilmektedir (110,111). MEFV mutasyon analizlerinin yapılması sorunu tam olarak çözmemektedir. Tipik klinik bulgusu olup

mutasyon saptanmayan vakalar da olabilmektedir. Tanıda klinik bulgular çok önemlidir. Tipik klinik bulguları olup MEFV mutasyonu tespit edilemeyen hastalarda kolşisin tedavisi başlanması ve tedaviye yanıtın izlenmesi önerilmektedir. Bazı hastalarda gen mutasyonu negatif olsa da henüz tespit edilememiş olan mutasyonların varlığı göz önünde bulundurulmalı, daha çok tipik kliniğe dayanarak tanı konulmalıdır (112).

2.2.3.Tedavi

AAA tedavisinde kullanılan en etkili ilaç kolşisindir. İlk kez 1972 yılında kolşisinin AAA ataklarının önlenmesinde etkili bir ilaç olduğu bildirilmiştir (113). Kolşisin sürekli kullanıldığı takdirde hem atakların ortaya çıkmasını hem de amiloidoz gelişmesini önler, bu nedenle hastaların tedaviye uyumları önemlidir (114).

Kolşisin yüksek konsantrasyonda nötrofil mikrotübüllerini tespit eder ve yeni mikrotübüllerin polimerizasyonu, hücre içi taşınım, mitoz, sitokin salınımını ve kemotaksisi önler (115). Ayrıca membran üzerindeki adezyon moleküllerinin (endotel hücrelerinde E-selektin, nötrofillerde Lselektin) ekspresyonunu azaltarak nötrofillerin hedef serozal dokulara bağlanmasını engeller (116).

Uzun dönem oral kolşisin tedavisi güvenli bir tedavidir. Kolşisinin yan etkileri sıklıkla ishal ve karın ağrısı olup özellikle yüksek dozlarda kullanımda gözlenir. Diğer görülen nadir yan etkiler kaşıntı, saç dökülmesi, lökopeni, trombositopeni, nöropati, myopati, karaciğer toksisitesi ve testis fonksiyon bozukluklarıdır (117). AAA'da kolşisin tedavisine yanıtızsızlık %5-10 oranında bildirilmiş olup atakların kontrol altına alınamadığı bu vakalarda, IL-1 reseptör antagonisti (Anakinra) ve IL-1 β monoklonal antikoru (Canakinumab) gibi biyolojik ajanlar da kullanılabilir (118).

2.2.4.Epidemiyoloji

AAA özellikle doğu Akdeniz havzasında yaşayan halklarda (Türkler, Aşkenaz Yahudileri, Sephardik Yahudileri, Durziler, Araplar, Ermeniler gibi bazı

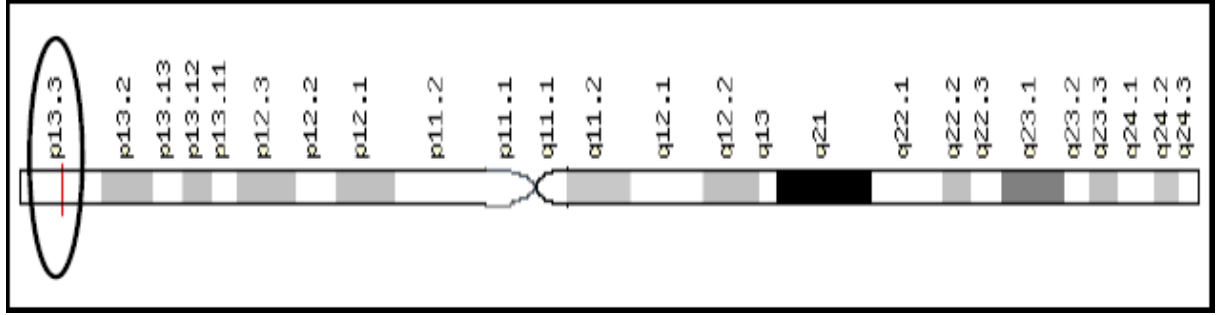
etnik gruplarda) daha sık görülmekle birlikte 20. yüzyılda yaşanan yoğun kıtalar arası göçlere bağlı olarak tüm dünya çapında yaygın olarak görülebilen bir hastalık olmuştur.

Japonya, İtalya, Fransa, Almanya, Avustralya, Polonya ve Brezilya'dan da AAA hastaları bildirilmiştir (92,93). Sefardik Yahudilerde AAA prevalansı 1/250 den 1/500 e kadar değişmektedir (117,119,120).

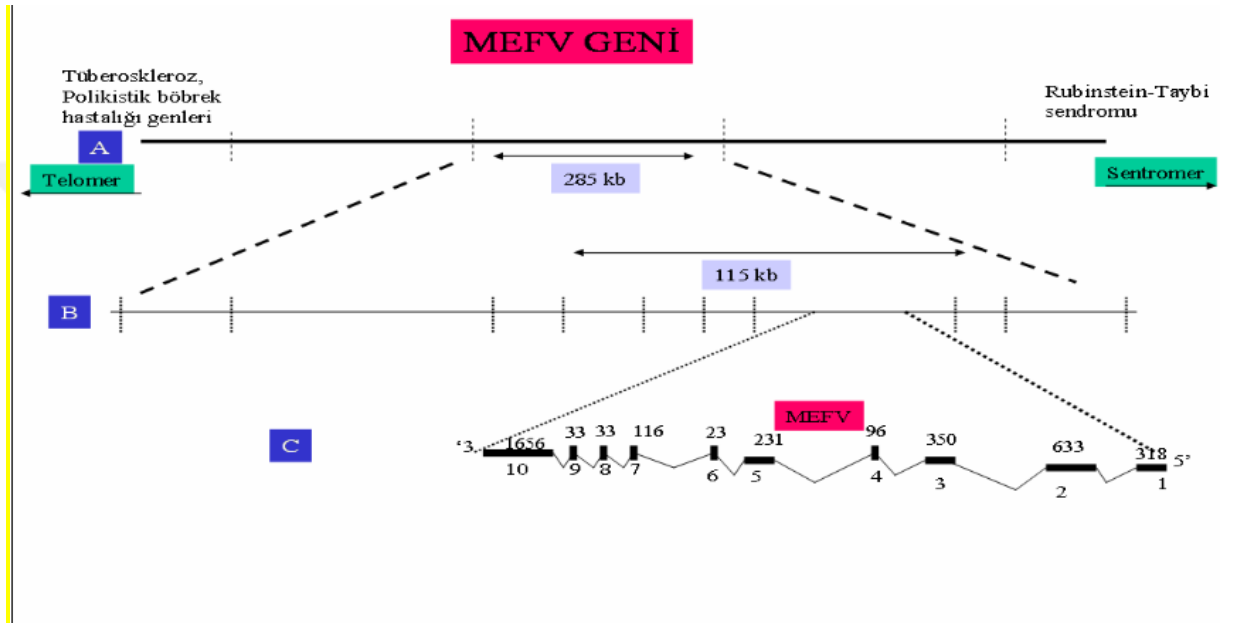
Taşıyıcılık frekansı ise popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Türklerde 1/5, Kuzey Afrika Yahudilerinde 1/6-8, Irak Yahudilerinde ise 1/13,3 ve İsrail'de 1/11 ve Ermenilerde taşıyıcılık frekansı 1/6-7, Araplarda 1/4,3 olarak saptanmıştır (121,101). Ancak Türkiye'nin belirli bölgelerinden köken alan kişilerde hastalığa daha fazla rastlanmaktadır. İsmindeki Akdeniz tanımlamasının aksine AAA daha çok İç Anadolu (Sivas, Tokat, Kayseri), Batı Karadeniz (Kastamonu, Sinop), Doğu Karadeniz iç kesimleri (Gümüşhane, Bayburt) Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da (Ağrı, Kars, Erzurum, Malatya) görülmektedir (112). Hastalığın Türklerdeki yaygınlığı 1/1075 ve Orta Anadolu'daki yaygınlığı ise 1/395 olarak bulunmuştur (112). Akraba evliliğinin fazla olduğu bölgelerde ortaya çıkma riski yüksektir. Otozomal resesif geçişli bir hastalık olan AAA'da akraba evliliği sıklığı %30-40 civarındadır (119,122).

2.3. MEFV GENİ

1992 yılında 16.kromozomun kısa kolunda (16p13.3) sırasıyla “telomer-D16S246 MEFVD16S138-sentromer”olarak belirlenmiş olan FMF geni, 1997 yılında iki ayrı uluslararası araştırma grubu tarafından (Fransız FMF Konsorsiyumu ve Uluslararası FMF Konsorsiyumu) birbirinden bağımsız olarak yürütülen çalışmaları sonucu pozisyonel olarak klonlanmıştır (22,100). MEFV (MEditerranean FeVer) geni olarak adlandırılan bu gen 16. kromozomun kısa kolunda (16p) 13.3 bölgesinde 10 ekzonluk, 15 kblık, 3505 nükleotitten oluşan bir gendir (123) ve 3,7 kb'lık zayıf bir transkript ekspre ederek 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (124,125).



Şekil 2.3. 16. kromozomda FMF geninin (MEFV) lokalizasyonu



Sekil 2.4: MEFV Geninin Yeri

A: MEFV geninin yeri

B: FMF aile çalışmaları ile tespit edilen bölge (285 kb), Askenazi olmayan Yahudilerde yapılan çalışmalarda saptanan bölge (115kb),

C: MEFV geninin genomik yapısı (126)

MEFV geni bulunduğundan sonra moleküler çalışmalar kısa sürede hız kazanmıştır (55,56). Aynı anda bulunan genin oluşturduğu proteine Fransız grubu “Marenostrin: Akdeniz”, diğer grup ise “Pyrin: Ateş” ismini vermiştir (123). Pyrin/Marenostrin proteini, granüositler, monositler, doku dentritik hücrelerde ile

deri, peritonyum ve sinoviyumdan elde edilen fibroblastlarda predominant bir şekilde ekspres edilmektedir (127,128,129).

MEFV genindeki 10 ekzon ve 9 intronun toplamı 14600 baz çiftidir ve intron-ekzon ile ilgili bilgiler Tablo 2.6’de verilmektedir.

Tablo 2.6: MEFV geni genel yapısı

Gen Adı	MEFV (Mediterranean Fever)	
Protein	Pyrin/Marenostrin	
Transkript pozisyonu	chr16:3292313-3306912(16p13,3)	Uzunluk
		14,600 bç
Kodlana DNA dizi analizi pozisyonu:	chr16:3293426-3306872	Uzunluk
		13,447 bç
Ekzon/İntron Numarası:	Pozisyon:	Uzunluk (bç)
Ekzon #1	3306914-3306596	317
İntron#1	3306597-3305076	1522
Ekzon #2	3305077-3304443	633
İntron#2	3304444-3300066	4379
Ekzon #3	3300067-3299716	350
İntron#3	3299717-3299290	428
Ekzon #4	3299291-3299194	96
İntron#4	3299195-3297532	1664
Ekzon #5	3297533-3297301	231
İntron#5	3297302-3296833	470
Ekzon #6	3296834-3296810	23

İntron#6	3296811-3294874	1938
Ekzon #7	3294875-3294758	116
İntron#7	3294759-3294572	188
Ekzon #8	3294573-3294539	33
İntron#8	3294540-3294178	363
Ekzon #9	3294179-3294148	30
İntron#9	3294149-3293983	167
Ekzon #10	3293984-3292313	1670
	Ekzonlar toplamı (mRNA)	3499

FMF geni (MEFV) lokalizasyonunun tam olarak belirlenmesi ve klonlanmasından sonra 1997 yılından itibaren hastalıkla ilgili mutasyonlar tanımlanmaya başlanmıştır. İlk bulunan mutasyonlar Fransız AAA Konsorsiyumu kendi çalışma gruplarında gösterdiği (M694V, M680I, M694I, V726A mutasyonlarıdır (92,97,117,119,130,131). 1998’de bu mutasyonlara ek olarak ekson 10’da dört tane daha nadir görülen yeni mutasyon tanımlanmıştır. Bu yeni mutasyonlar 692’de delesyon, Lys695Arg, Ala744Ser, Arg761His’dir. Bundan sonra ekson 2, 3, 5, 1 ve 9’da 36 mutasyon belirlenmiştir (92,126,131,132). 2001 yılında FMF hastalığı ve diğer ailesel tekrarlayıcı ateşe neden olan genetik bölgelerdeki mutasyonların tek bir veritabanı içerisinde toplanması amacıyla kurulmuş FMF veri tabanında 2014-05-15 tarihine kadar 296 gen değişimi bildirilmiştir. (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php>). MEFV geninde bugüne kadar saptanmış olan mutasyonlar Şekil 2.5’de verilmiştir.

Tablo 2.7: Farklı toplumlara ait AAA MEFV geni mutasyon dağılımı (135)

	Allel Sayısı	% M694V	% V726A	% M680I	% M694I	% E148Q	% Diğer
Türkler	1390	45	11	13	6,9	2	21,9
Araplar	706	19,9	14	6,9	12	5,9	41
Ermeniler	6000	43,1	19	15,9	0,3	1,8	19,7
Lübnanlılar	1116	17,3	11,1	4,2	7,3	4,7	55,1
Yahudiler	1302	65	2,9	0,9	0	4,9	10,5
Yunanlılar	304	26,3	6,9	12,8	2,6	6,2	45
Tunuslular	278	10,4	1,7	12,2	5	6,8	63,6
Fransızlar	86	4,6	0	0	4,6	6,9	83,7
İtalyanlar	62	16,1	4,8	9,6	8	17,7	43,5
Gritliler	142	27,4	4,9	0	7	14	46,4
Kıbrıslılar	68	17,6	10,2	0	2,9	7,3	54,4
Ürdünlüler	110	24,5	13,6	9	1,8	4,5	46,3
Suriyeliler	166	45,7	13,8	9,6	4,8	6	19,8
İspanyollar	100	12	1	0	4	5	78
Toplam	11830	39,5	13,9	11,4	2,8	3,3	28,8

Kemik iliği ve periferik kan lökosit ekspresyon analizi sonucu, MEFV dominant olarak AAA'daki inflamatuvar eksudadaki major hücre tipini oluşturan nötrofillerde ve eozinofiller ile monositlerde ifade edilmekte, lenfositlerde ise bulunmamaktadır (136). MEFV ayrıca dendritik hücrelerde ve sinovyal fibroblastlarda da ifade edilmektedir (137). Monositlerde ise MEFV ifade düzeyi değişken olup proinflamatuvar ajanlar olan IFN- γ , TNF ve lipopolisakkarit ile ifade artmaktadır. Ayrıca sinovyumda, peritonda ve ciltte bulunan fibroblastlarda da MEFV gen ekspresyonu görülmekte olup nötrofillere göre daha düşük seviyededir ve de IL-1 β ve forbol miristat asetat (PMA) ile ekspresyon artmaktadır (129). Bu durum AAA'daki serozal, sinovyal ve cilt inflamasyonuna yakınlığı açıklamaktadır.

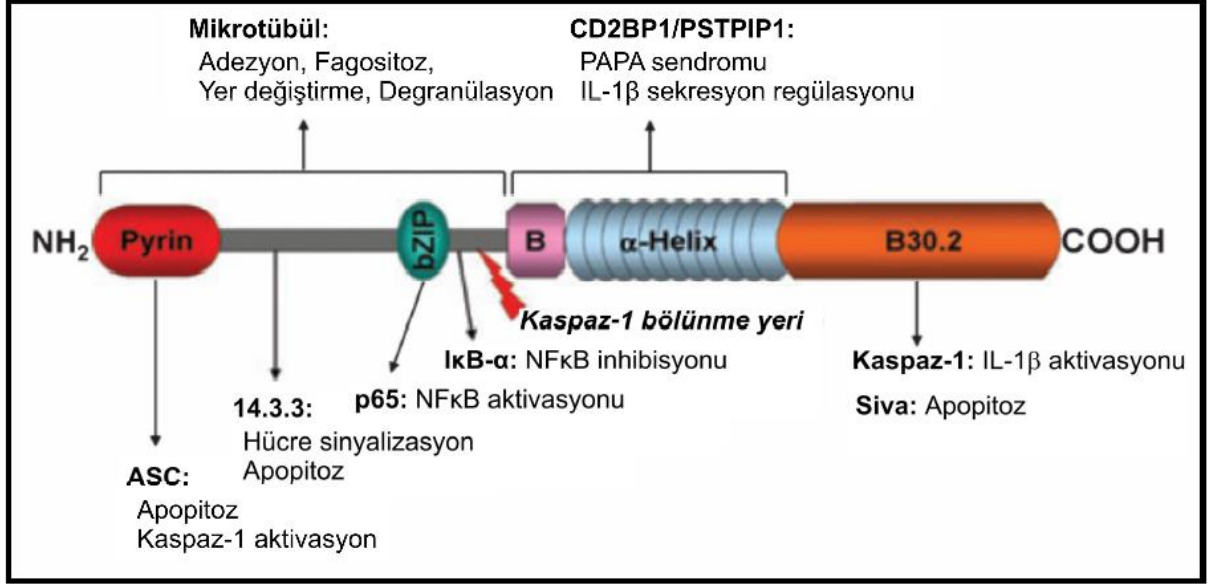
MEFV gen ürünü olan Pyrin proteini 781 aminoasitten oluşmaktadır. Monositlerde sitoplazmada, sinovyal fibroblast ve nötrofillerde ise çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir.

Pyrin proteininin inflamasyonda baskılayıcı işlevi olduğu düşünülmektedir (102). En yaygın gözlenen mutasyonlar (M680I, M694V, M694I, V726A) proteinin C-terminal B30.2 'domain'ini kodlayan 10. ekzondadır. Bu mutasyonlar sonucunda çeşitli nedenlerle uyarılan iltihabi reaksiyonlar durdurulamamakta ve ateş ile birlikte, periton, plevra, eklemler ve deri gibi belirli bölgelere sınırlı enflamasyon ataklarıyla karakterize klinik tablo ortaya çıkmaktadır. AAA hastalığının patogenezinde; mutant MEFV gen ürünü olan pyrin'in fonksiyon bozukluğu olduğu belirtilmiştir (138).

2.3.1.Pyrin Proteini

Pyrin proteini, beş fonksiyonel domain (bölge) içermektedir (Şekil 2.6) (138).

1. Amino (N) ucu PYRIN domaini (PAD, PyD veya DAPIN olarak da isimlendirilir)
2. bZIP (transcription factor basic domain)
3. α -helical (Coiled coil) domain
4. B-box zinc finger domain (BB-ZF)
5. Karboksi (C) ucu B30.2 domain (PRYSPRY)



Şekil 2.6: Pyrin proteinin şematik görünümü (138).

Her bir bölgenin inflamasyonda hücre ölümü regölasyonu, sitokin sekresyonunun transkripsiyonel regölasyonu ve hücre içi sinyal iletimi ile ilişkili proteinlerle protein-protein etkileşimleri aracılığıyla farklı rolleri vardır. Çoklu bağlanma noktalarının tespiti pyrin'nin çeşitli moleküler yollara katılır olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde pyrinin kısıtlı ekspresyon göstermesi düşünüldüğünde, pyrin en önemli rolü, inflamasyon regölasyonunda görünmektedir (138).

Pyrin, apoptoz ve inflamasyonun regölasyonunda yer alan proteinler sınıfına aittir. Pyrin, Tripartite motif (TRIM) protein ailesine dahildir. TRIM familyası proteinler bir RING alt birimi, B-kutusu (B-box) olarak adlandırılan bir veya iki çinko bağlayıcı alt birim ve bir yumaksı sarmal (coiled-coil) alt birim olmak üzere üç alt birime sahiptirler. Pyrin (TRIM 20) TRIM ailesinin RING alt birimi içermeyen atipik bir üyesidir. Bununla birlikte B-kutusu, yumaksı sarmal ve B30.2 alt birimlerini içerir (139).

Pyrin proteininin FMF'deki fonksiyonu henüz iyi anlaşılamamış olmasına rağmen inflamasyonu direkt veya indirekt baskılayıcı işlevi olduğu düşünülmektedir. İlk klonlandığında pyrinin N terminal bölgesi dizi veritabanlarında diğer proteinlerle ilişkili bulunmuştur. Günümüzde ise N terminal ucun ilk 92 aminoasitlik kısmı pyrin

bölgesi olarak bilinmektedir. Pyrinin N-terminali, apoptoz ve inflamasyonda yer alan bir çok proteinle homoloji göstermekle birlikte, N-terminalindeki bu yaklaşık 90 amino asitlik bölgesi PYRIN, PYD, PAAD veya DAPIN olarak da adlandırılmaktadır (140). PYD alt birimi ölüm domeini (Death Domain, DD), ölüm efektör domeini (Death Efektör Domaini, DED) ve Kaspaz toplanma bölgesi (Caspase Recruitment Domain, CARD) içermektedir. DD, DED ve CARD domeinleri apoptozis ve inflamasyonda görev alan, protein-protein etkileşiminden sorumlu alt birimlerdir (139). Yapısal olarak pyrin, Death Fold süperfamilyasının bir üyesidir ve N-terminalindeki PYD, DD, DED ve CARD domainleri homoloji gösterir. Bütün bu domainler homotipik protein-protein etkileşimlerine katılır (141,142). Protein-protein etkileşim domainleri hücre içi sinyal iletiminde önemli rol oynarlar (143). İnflamasyon ve apoptozis sinyal yolunda görevli 3 kısım olan DD, DED ve CARD domainlerini taşıyan proteinler önemlidir (144). Dizi benzerliklerinin düşük olmasına rağmen bu homotipik etkileşim gösteren domainler death-domain fold olarak sınıflandırılmışlardır ve inflamasyon ve apoptozisin regülasyonunu kapsayan proteinlerin bir miktarında bulunur (145). Yaklaşık 100 amino asit uzunluğundaki bu domainler spesifik downstream hedeflerin aktivasyonuna yol açan sinyal molekülleri arasında homotipik protein-protein etkileşimine aracılık ederler. Bu domainler arasında DD-DD etkileşimi, DED-DED etkileşimi ve CARD-CARD etkileşimler, kaspaza benzer reseptörden efektöre sinyallerin düzenlenmesi ve iletilmesi için gereklidir (146).

Yabanıl ve mutant tip pyrinin fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen FMF'in inflamatuvar fenotipi ve belirli popülasyonlardaki yüksek taşıyıcı frekansı, doğal bağışıklığın düzenlenmesinde pyrinin önemli bir rol oynadığını gösterir (147). Yabanıl tip pyrin anti-inflamatuvar olarak düşünülür. Monosit ve nötrofillerin apoptozisine neden olarak inflamasyon yerinde toplanmayı azaltır (148,149).

N-terminalinde bulunan 92 amino asitlik PYD, inflamatuvar ve sitokin ekspresyonu sırasında gen transkripsiyonunda anahtar moleküle bağlanma yeteneğindedir (148).

2.3.2.İnflamazom

Pyrin proteinin inflamasyondaki rolünü anlamak için inflamazom kompleksini tanımlamak gerekir.

Steril hücre ölümü veya hasarına karşı gelişen inflamatuvar yanıtlar infeksiyonlardaki inflamatuvar yanıtlara benzer olduğundan, mikroorganizmalara karşı gelişen immün yanıtlara aracılık eden aynı konakçı reseptörleri, steril inflamasyonun aktivasyonunda da yer alabilir (41). Germline’da kodlanan ve patojenle ilişkili moleküler paternleri (PAMP’lar) tanıyan beş farklı tipte Patern Tanıma Reseptörü (PRR’ler) tanımlanmıştır (52).

- a. TLR: Hücre membranı veya endozomlarda yer alan Toll-benzeri reseptörler
- b. NLR: Sitoplazmik Nucleotide-Binding Oligomerization Domain (NOD) benzeri, lösinden zengin tekrarlar (LRR) içeren reseptörler
- c. RLR: İntraselüler yerleşimli ve antiviral immünitede önemli Retinoic-Acid-Inducible Protein-1 (RIG-1) benzeri reseptörler
- d. CLR: C-tipi lektin reseptörleri
- e. ALR: Bir pyrin bölgesi ve intraselüler mikrobiyal DNA’nın tanındığı DNA-bağlayıcı HIN bölgesine sahip Absent in Melanoma 2 (AIM2) benzeri reseptörler

PRR’leri “damage ilişkili moleküler paternler (DAMPs)” olarak bilinen, doku hasarına yol açan ve infeksiyöz olmayan moleküller ile hücrel hasar sırasında salgılanan endojen molekülleri de tanırlar. DAMP’lar normal fizyolojik koşullarda hücre ya da ekstraselüler matriks içinde yerleşen ve böylece immün sistemden gizlenen, ancak hücrel stres veya hasar koşullarında ölen hücreler ya da ekstraselüler matriksten serbest kalarak steril inflamasyonu başlatan endojen faktörlerdir (50). Özgül ligandı ile bağlanan bu PRR’ler NF-kB, mitojen ile aktive protein kinaz (MAPK) ve tip 1 interferon yollarını uyararak proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimini ve salgılanmasını başlatırlar (28).

Endojen DAMP molekülleri yapısal ve işlevsel olarak oldukça heterojen bir grup olsa da bu steril uyarılara veya diğer infeksiyöz uyarılara aynı immünolojik/inflamatuvar yanıtların verilmesi, endojen uyarıların tanındığı ve steril inflamasyonun başlatıldığı üç farklı mekanizmanın kullanıldığını düşündürmektedir (10).

I. IL-1a gibi hücre-içi proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salgılanması

II. Normalde mikrobiyal tanıma işleminde kullanılmayan reseptörlerin doğrudan aktivasyonu

III. DAMP molekülleri tarafından PRR'lerin ve ilişkili inflamazomun aktivasyonu ve sonraki sinyal iletimi

İnflamatuvar hücreler tarafından IL-1b üretimi, *inflamazom* adı verilen ve temel görevi kaspaz-1'in aktivasyonu olan bir multiprotein kompleksi tarafından düzenlenir. İnflamazom kompleksi, sıklıkla NLR ailesinin üyelerinden bir PRR, bir adaptör protein olan ASC [apoptosis-related speck like protein containing a CARD (caspase activation and recruitment domain)] ve kaspaz-1'in aktif formundan meydana gelir (46). Ligandı ile bağlanan NLR oligomerize olur ve protein-bölge etkileşimleriyle ASC adaptör proteinine bağlanır. ASC ise CARD bölgesiyle pro-kaspaz-1'i biyolojik olarak aktif kaspaz-1'e dönüştürür. Aktif kaspaz-1 ise IL-1b, IL-18 ve IL-33 sitokinlerinin öncül formlarını proteolitik olarak keser ve matür formlarına dönüştürür. IL-1b ve IL-33 steril inflamasyonla ilişkilendirilmişse de IL-18'in steril inflamasyondaki rolü tam olarak açıklanamamıştır.

İnflamazom kompleksleri, bulundukları PRR yapısına göre adlandırılır ve işlev görürler. Dört farklı sınıf altında 20'den fazla NLR gösterilmiş olsa da halen tanımlanmış dört farklı inflamazom kompleksi bulunmaktadır (24).

- NLRP1 (NOD-, LRR- ve pyrin domain-containing 1) inflamazom
- NLRP3 (NOD-, LRR- ve pyrin domain-containing 3) inflamazom
- NLRC4 (NOD-, LRR- ve CARD domain-containing 4) inflamazom
- AIM2 (Absent in melanoma 2) inflamazom.

Bu inflamazom komplekslerinden yalnızca AIM2 ve NLRP3 inflamazomun mikrobiyal olmayan molekülleri tanıyabildikleri gösterilmiştir (150).

2.3.3.Pyrin Proteininin İnflamasyondaki Yeri ve Bozulmuş Fonksiyonu

MEFV gen ürünü olan pyrin fonksiyonunun anlaşılmasıyla sadece AAA patogenezi değil aynı zamanda genel olarak inflamasyon döngüsünü de aydınlatılabilecektir. Kemik iliği hücrelerinde MEFV mRNA'sı belirlenememiştir. Pyrinin yaygın olarak olgun nötrofillerde eksprese edilmesi bu proteinin muhtemelen inflamasyon mediatörlerinin down regülasyonunu sağladığını düşündürmektedir (22,151). Nötrofiller akut inflamasyonun ana hücreleri olduğundan, pyrinin bu hücrelerdeki rolü önemli olabilir. Burada önemli bir diğer nokta ise şudur; sinovyal ve peritoneal hücrelerdeki pyrin ekspresyonunun yetersizliği bu proteinin doku spesifik tarzda etkili olmadığını göstermektedir (152). AAA hastalarında MEFV mRNA ekspresyonu sağlıklı kişilere göre düşük düzeyde bulunmuştur (153). Mutasyon nedeniyle pyrinin görev yapamaması, kontrolsüz nötrofil aktivasyonuna ve bu hücrelerin serozal dokulara göçüne neden olabilir. Bununla birlikte hedefin niçin serozal dokular olduğu açıklık kazanmamıştır (152).

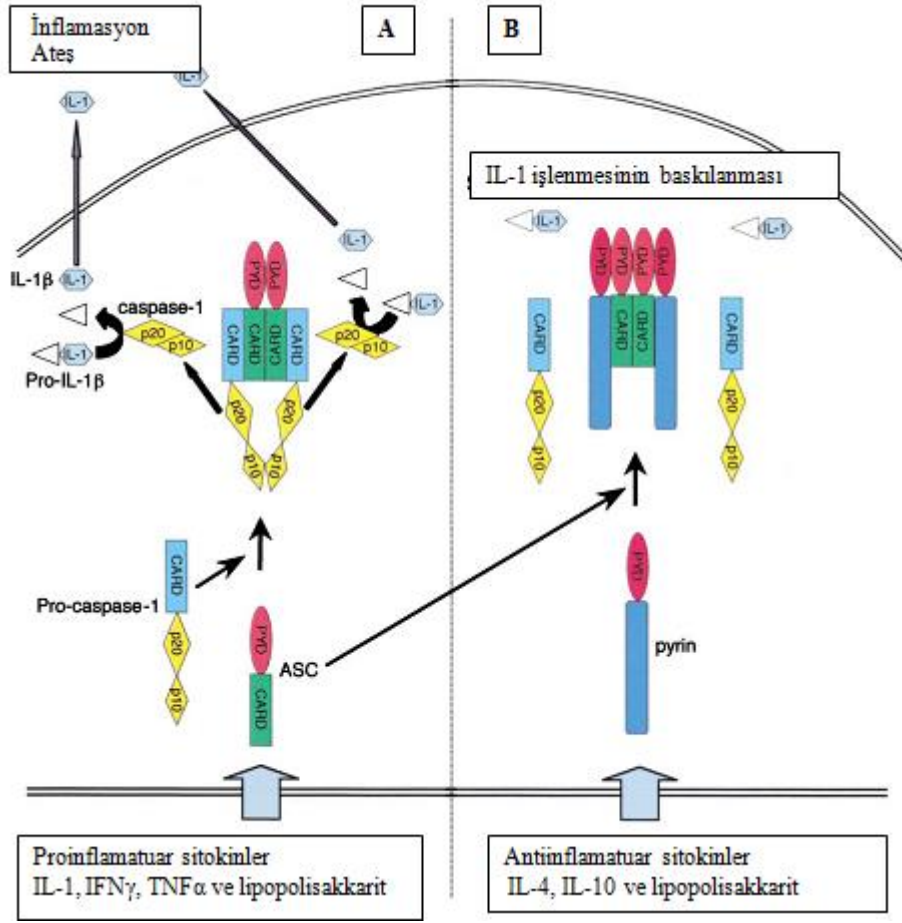
Patogeneizde ileri sürülen hipotezlerden en çok kabul göreni; MEFV geninin kodladığı Pyrin/Marenostrin proteininin nötrofil aracılıklı inflamasyonu baskılamasında aksama olmasıdır. Mutasyona uğramış olan genin proteini, inflamasyondaki kontrol görevini yapamamaktadır. Bugün için tam olarak bilinmeyen nedenlerle uyarılmış olan inflamasyon durdurulamamakta ve ateşle birlikte belirli bölgelerde sınırlı inflamasyon atakları ile karakterize klinik tablo ortaya çıkmaktadır (154).

Pyrin proteininin fonksiyonunu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda bu proteinin ASC protein (apoptosis-associated speck like protein with a CARD) ile ilişkisi saptanmıştır Pyrin, N-terminali PYRIN domaini aracılığı ile "ASC" proteinine bağlanır. ASC; amino ucunda PYRIN domaini, karboksi ucunda (C) CARD içeren adaptör bir proteindir (155). ASC, inflamazom denilen sitoplazmik multiprotein kompleksinde yer alan, IL-1 β , IL-18, IL-33 maturasyonunda önemli kaspaz'ın proteolitik aktivasyonuna aracılık eder (156,157).

Yapısındaki stres duyarlı komponentlerden (stress-sensing components) özellikle nükleotid bağlanma ve oligomerizasyon domain (NOD) benzer reseptörlerine (NLRs) göre birçok inflamazom olduğu ileri sürülmüştür. Örnek olarak NACHT, LRR, pyrin domain içeren protein (NLRP veya NALP)1, NLRP2, NLRP3 ve ICE proteaz aktivasyon faktör (IPAF). Günümüzde interferon'u indükleyebilen yeni bir inflamazom komponenti olan, HIN 200 aile üyesi olan AIM2 tanımlanmıştır (158,159).

NLRP ve AIM2 inflamazomlarında ASC, N terminal PYRIN ve C terminal CARD bölgesi aracılığıyla stres duyarlı komponentle prokaspaz arasında adaptör molekül görevi yapar. NLRP3-inflamazomunda ASC, N terminal PYRİN-PYRİN etkileşimi ile NALP3'e, C terminal CARD-CARD etkileşimi ile de prokaspaza bağlanır (Şekil 2.7) (138).

Kompleks içinde ikinci prokaspaz-1 molekülüne CARD eklenir ve proteolitik aktivasyon sonucu aktif katalitik domainler olan p20 ve p10 salınır. Aktif kaspaz 1, proIL-1'i parçalayarak IL-1 oluşumuna neden olur. ASC; PYRIN domaini aracılığıyla pyrin ile etkileşimi düşünüldüğünde, NLRP2/3 veya AIM2 inflamazomunda ya modulator olarak ya da kendisi bizzat inflamazomun bileşeni olarak rol almaktadır (138). Yabani tip (WT: Wild Type) pyrin'in B30.2 bölgesi, aktif kaspaz-1 alt birimleri olan p20 ve p10 ile etkileşime girerek, aktif p20/10 heterodimer oluşumunu önler. Bu etkileşim kaspaz 1 aktivasyonun ve sonrasında IL-1 β sekresyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır. Çünkü B30.2 domaini kaspaz 1'in p10 ve p20 subünitlerine bağlanır, bunun sadece procaspaz 1'in proteolitik aktivitesini inhibe etmediği aynı zamanda p10p20 heterodimerinin yani aktif kaspaz 1'i de inhibe ettiği düşünülür. Dahası pyrinin B30.2 bölgesi proIL-1 β ile etkileşime girer ve bu etkileşim IL-1 β 'nın sekresyonunun blokajına ek bir katkıda bulunur (160).



Şekil 2.7: Pyrin proteini ile ASC arasındaki ilişkinin şematik olarak gösterimi (161)

A: Lipopolisakkarit ve proinflamatuvar sitokinler ASC'yi tetikleyerek, prokaspaz-1 aktivasyonu ve CARD interaksiyonları oluşumuna sebep olmakta ve inflamasyon başlatılmaktadır.

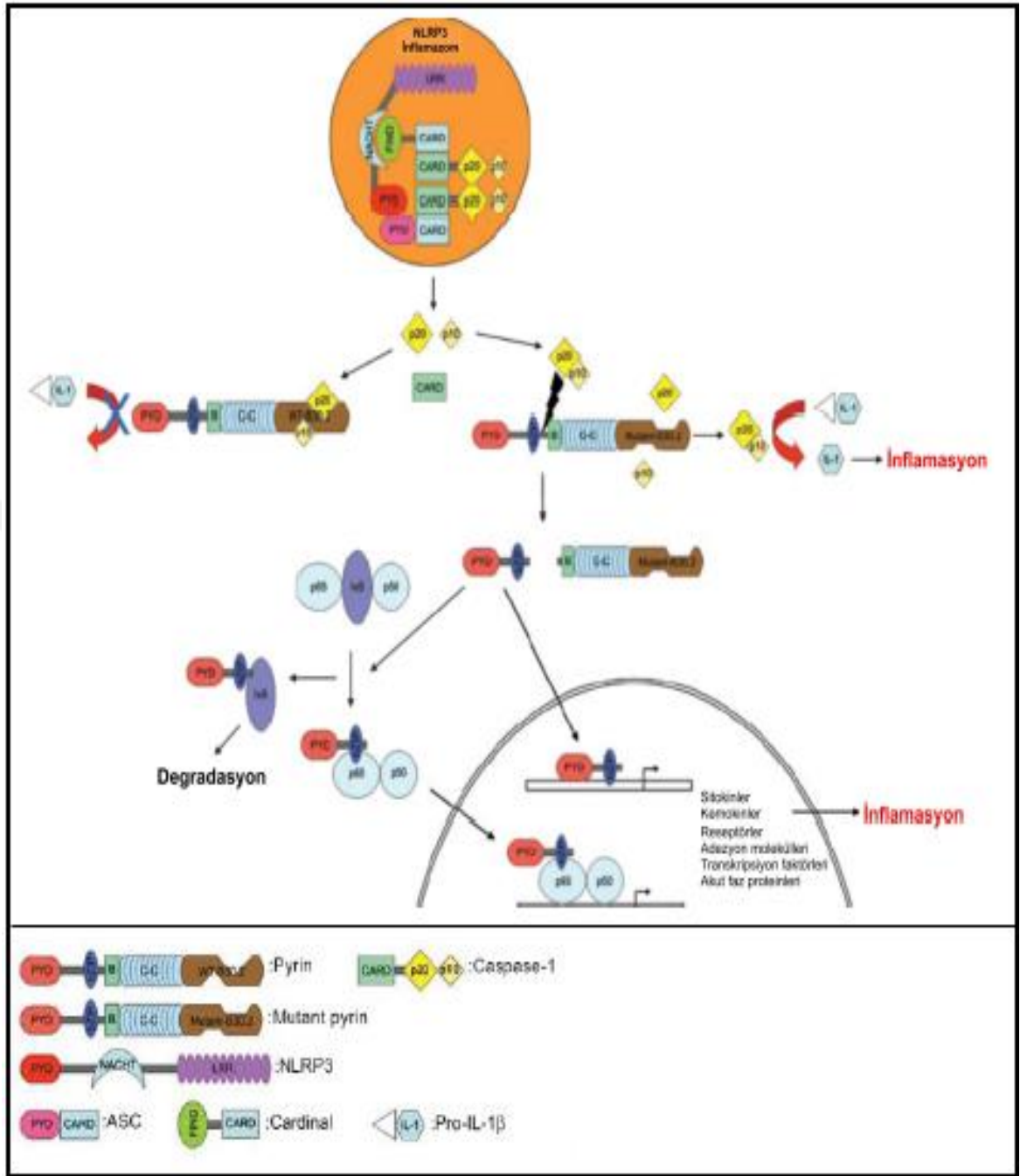
B: Lipopolisakkarit ve antiinflamatuvar sitokinlerin pyrini tetiklemesi ile pyrin ASC'ye bağlanmakta ve ASC'nin diğer bağlantılarını bloke etmektedir. Böylece IL-1 işlenmesi baskılanmaktadır.

2.3.3.1 Pyrin'in Kaspaz-1 Tarafından Parçalanması ve NF- κ B Aktivitesinin Artırılması

AAA ilişkili mutant pyrin'in B30.2 bölgesinin p20 ve p10 ile etkileşimi, wild tip (WT-Mutant) pyrin'in B30.2 bölgesine göre daha azdır ve böylece p20 ve p10 heterodimeri oluşarak pyrin'i bZIP domain ile B-box zinc finger domain ortasındaki Asp330 bölgesinden ikiye parçalar. Pyrin 'i ASC bağımsız NF- κ B aktivasyonunda rol alan, 330 aa N-terminal ve C-terminali 431 aa olan iki kalıntıya ayırır (şekil 2.8). B30.2 bölgesinde mutasyon olan pyrin proteinin caspas-1 parçalamasına karşı hassasiyeti mutant pyrinin değişik bağlanma ve inhibitör etkisiyle ya da konformasyonel değişikliği ile açıklanabilir (162).

Pyrin yarılmaması proteinin hücre içi lokalizasyonuna yeni bir boyut kazandırır. Pyrin proteinini kodlayan MEFV geni klonlandığından bu yana pyrinin primer yapı analizlerinde transkripsiyon faktörü olabileceği öngörülmüştür (22). Pyrinin N-terminal parçasının nükleer lokalizasyonu pyrinin nükleer faktör olma ihtimaline yeniden bir pencere açmıştır. Pyrin gibi MyD88 adapter-like (Mal)ve Toll-like receptor (TLR) 2 ve TLR4'e ait adaptör proteinlerin de caspas 1'ce parçalandıktan sonra NF- κ B yi aktive ettikleri gösterilmiştir (163).

Değişik transfeksiyon çalışmalarında ASC bağımlı NF- κ B aktivasyonun da negatif, pozitif ya da regülatuar rolü olduğu yönünde sonuçlar çıktığı için pyrinin NF- κ B aktivasyonuna etkisi açık değildir. Bütün pyrinin etkisindeki çelişkilere bakılmaksızın pyrinin N-terminal parçasının NF- κ B aktivasyonunun potansiyel artırıcısı olduğu görülmektedir. Oluşan N-terminal pyrin parçası, NF- κ B aktivitesi 2 yolla artırır; ya p65 NF- κ B'nin nukleusa girişini arttırarak ya da I κ B- α 'nın yıkılımını arttırarak. Artan NF- κ B aktivitesi de inflammatuar sitokin salınımını artırır (Şekil 2.8).



Pyrin'in antiinflamatuvar bir protein mi, proinflamatuvar bir protein mi olduğu, mutasyonların pyrin proteininde fonksiyon kaybına mı yoksa yeni fonksiyon kazanımına mı yol açtığı henüz tam netleşmemiştir (138).

Pyrin proteininin inflamasyondaki rolü AAA ilişkili mutasyonların çoğunun pyrin'in C terminal B30.2 domain bölgesinde olduğu düşünüldüğünde bu bölge aracılığıyla Kaspaz-1'in inhibisyonu, AAA patogenezinin moleküler düzeyde açıklanmasında önemli olduğu düşünülmüştür. Üç major AAA mutasyonundan (M694V, M680I, V726A) birlikte olduğu pyrin'in yine kaspaz-1'e bağlanacağı ama etkileşimlerinin WT'e göre daha düşük düzeyde olacağı bildirilmiştir (162). Pyrin'in ve kaspaz-1'in kristal yapısı düşünüldüğünde M694V ve M680I pyrin mutasyonlarının, bu ara bağlanma yüzeyinde olduğu görülmüştür.

Sonuçta mutant pyrin ile kaspaz-1 arasındaki etkileşimin azalması pyrin'in IL-1 β sekresyonu üzerindeki inhibitör etkisini azaltır. Bu veriler de pyrin'in IL-1 β üzerindeki inhibitör etkisini göstermekte ve AAA'nın patogenezinde kontrolsüz kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 β sekresyonun olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte farklı transfeksiyon çalışmalarında M694V mutant ve WT pyrin'in kaspaz-1 ile etkileşiminde farklılık gözlenmemiştir. Bu çelişkinin nedeni olarak da farklı transfeksiyon çalışmalar olabileceği düşünülmüştür (160).

2.3.4. Otoinflamatuvar Hastalıklar ve İnflamazom Kompleksi İlişkisi

Otoinflamatuvar hastalıklar kendiliğinden oluşan, yüksek titre otoantikor ve antijen spesifik T hücrelerinin olmadığı inflamasyon vakaları olarak tanımlanırlar. 10 yıl önce, kalıtsal yüksek ateş sendromlarına neden olan genlerin bulunması ile bu kavram ortaya atılmıştır. Bu nozoloji, gerek mendelian gerekse kompleks otoinflamatuvar hastalıkların genetik kökeni hakkındaki bilgimizin hayli ilerlemesi ve bu hastalıkların kalıtsal bağışıklık sisteminin genetik değişkenlerinden kaynaklandığının teşhis edilmesi sebebiyle yerleşik hale gelmiştir. Masters ve arkadaşları son on yılda kazanılan moleküler anlayışlara dayanarak güncellenmiş bir sınıflama şablonu önermiştir (1). Bu sınıflamanın, genetik, otoimmün ve terapötik ilişkileri açıklamayan, ama şimdiye kadar kullanılan klinik sınıflamanın, yerini alacağını belirtmişlerdir. Otoinflamatuvar hastalıkları altı sınıfa kategorize etmişlerdir:

IL-1 β aktivasyon bozuklukları (inflamazomopatiler), NF- κ B aktivasyon sendromları, yanlış protein katlanma hastalıkları, kompleman düzenleyici hastalıklar, sitokin salgılama bozuklukları ve makrofaj aktivasyon sendromları. Moleküler patofizyolojiye dayanan bu sistem, her alanda yeni hipotezler üretirken bu söyleme de açıklık getirecektir.

Otoinflamatuvar terimi, bu hastalıkların kategorisini, daha klasik kabul edilen, adaptif imunitenin ayırt edici özelliklerinin daha belirgin olduğu sistemik lupus eritematosus (SLE) ve romatoid artrit (RA) gibi otoimun hastalıklardan ayırt etmek için kullanılmaktadır.

Sistemik otoinflamatuvar hastalık fikri öncelikle dominant geçişli kalıtsal yüksek ateş sendromlu ve yaygın iltihaplı hastalardaki p55 Tumor Nekroz Faktöründe (TNF) ektodomin mutasyonlarının saptanması ile öne sürülmüştür (TNF reseptör- ilişkili periyodik sendrom, TRAPS) (166).

Bu keşif benzer bir resesif kalıtsal ailesel hastalık olan Akdeniz ateşindeki gen klonlamasını yakından takip eder. Bu durum hastalıkların yeni ortaya çıkan bir inflamatuvar hastalık ailesi için prototip olabileceği ihtimalini ortaya atar. FMF ve TRAPS görünüşte sebepsiz tekrarlanan ateş atakları, serozit, artrit ve deri iltihabı ile karakterize edilir, ancak otoimunitenin olağan belirtilerinden yüksek-titre antikorlar ve antijen-spesifik T hücreleri FMF ve TRAPS da genelde mevcut değildir.

Daha sonra bir baska kalıtsal periyodik ateş sendromu olan hiperimmunglobulin D'nin (HIDS) altında yatan gen saptandı (167,168). Soğuğa maruz kalındığında ateş, halsizlik, deri döküntülerine sebep olan kalıtsal bir genin konumsal klonlanması gerçekleşti (169).

Moleküler temellerinin daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasından ziyade klinik sunumlarına dayanarak, otoinflamatuvar hastalıklar evrenine bazı yeni kategoriler eklendi –Gut gibi metabolik bozukluklar ve diğer Cristalin Artropati'ler, Herediter Anjioödem gibi kompleman hastalıkları, Crohn ve Blau syndrome (Chronic Granulomatous Synovitis with Uveitis and Cranial Neuropathy) gibi granulomatoz hastalıklar, Gaucher and Hermansky-Pudlak sendrom gibi depo hastalıkları, İdiopatik Pulmoner Fibrosis gibi fibrozis temelindeki hastalıklar, Behçet gibi vaskülitik sendromlar (170).

Bu formülasyon, otoinflamasyon ile ilişkili fenotip kapsamı genişletmekle kalmamış aynı zamanda bu kavramı genetik olarak kompleks hastalıklar dünyasına da genişletmiştir.

Daha yakın zamanda başka hastalık sınıfları da otoinflamatuvar başlığı altına toplanmıştır - İdiopatik Febril Sendromlar [Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis (SoJIA); erişkin Still hastalığı; aftöz stomatit, faranjit ve servikal lenfadenopati ile periodik ateş sendromları (PFAPA)] (171,172), Piyojenik Artrit, Piyoderma Gangrenosum ve akne gibi piyojenik hastalıklar (PAPA) (173) ve inflamatuvar kemik hastalıkları (174).

Klinik otoinflamatuvar hastalık kavramı ile doğal bağışıklık biyolojisinin önemli yakınlaşması ise 3 yerleşik otoinflamatuvar hastalığın hepsine NLRP3 (CIAS1 –Cold Induced Autoinflammatory Syndrome 1, NALP3, PYPAF1 ve CLR1.1 olarak da bilinen) içinde meydana gelen fonksiyon kazanım mutasyonlarının aktivasyona sebep olduğunun keşfi ile oldu. Bu da doğal bağışıklık sisteminin yeni tanınan moleküler kilidinin kodlanmasına neden oldu (169,175,176).

NLRP3'teki hastalıkla bağlantılı mutasyonların keşfi, otoinflamatuvar hastalık ve doğal bağışıklık arasındaki bağı çeşitli nedenlerle güçlendirdi. İlk olarak başta cryopyrin olarak adlandırılan NLRP3 protein ürününün, şimdiki adıyla NLRP3, çeşitli mikrobik ürünleri ve endojen 'tehlike sinyallerini' (hasara bağlı molekül kalıplarını, DAMP) algılayıp caspase-1'i aktive eden, böylelikle doğal bağışıklık tepkisinde önemli bir adım olan IL-1 β ve IL-18 süreçlerini başlatan inflamazom adlı makromoleküler bir kompleksin bir parçası olması (157). İkinci olarak NLRP3 inflamazom, pyrin (FMF'teki) (17) ve PSTPIP1 (PAPA endromindeki) (173) gibi varsayılan diğer otoinflamatuvar hastalıklardaki mutasyona uğramış proteinlerle direk veya doğrudan ilişkiye geçebilir. Üçüncü olarak inflamazomun artık, gut ve pulmoner fibroz (177-179) gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde gösterilmesi, otoinflamasyonun genişletilmiş tanımına eklenerek klinik sınıflandırmaya moleküler bir teyit imkanı sağlamıştır. Son olarak NLRP3, NLR ailesi olarak bilinen ve doğal bağışıklık sistemi ile yakından bağlantılı olan bir protein ailesinin prototipidir. Adaptif bağışıklığın özelliklerini taşımayan bu inflamatuvar hastalıkların aslında doğal

bağışlık sistemi bozuklukları olduğunun tanınmasıyla, altında yatan moleküler mekanizmalar (Tablo 2.9) temelinde yeni bir şablon önerilmiştir (1).

Tablo 2.9: Otoinflamatuvar hastalıkların geçici moleküler/fonksiyonel sınıflaması

Hastalık	Gen (Kromozom)	Protein (sinonimleri) ya da patolojik stimulus
Tip 1: IL-1β Aktivasyon Hastalıkları (İnflammasomopatiler)		
İntrensek		
FCAS, MWS, NOMID/CINCA	NLRP3/CIAS1(1q44)	NLRP3 (cryopyrin, NALP3, PYPAF1)
Ekstrensek		
FMF	MEFV	Pyrin
PAPA	PSTPIP 1 (15Q24-25.1)	PSTPIP 1 (CD2BP1)
CRMO/SAPHO	Kompleks	
Majeed Sendromu	LPIN2 (18p11.31)	Lipin-2
HIDS	MVK (12q24)	Mevalonate kinase
Recurrent Hydatiform Mole	NLRP7 (19q13)	NLRP7 (NALP7, PYPAF3, NOD12)
DIRA	ILIRN	IL-1Ra
Kompleks/Kazanılmış		
Gut, Pseudogut	Kompleks	Ürik asit/CPPD
Fibrozis hastalıkları	Kompleks	Asbest/slika
Tip2 DM	Kompleks	Hipergisemi

Tip 2: NF-β aktivasyon hastalıkları		
Crohn Hastalığı	Kompleks	Muramyl dipeptide
	NOD2 (16p12)	NOD2 (CARD15)
	ATG16LI (2q37.1)	ATG16LI
	IRGM (5q33.1)	IRGM
	NOD2 (16p12)	NOD2 (CARD15)
	NLRP12 (19q13.4)	NLRP12 (NALP12)
Tip 3: Doğal İmmun Sistemin Protein Katlanma Hastalıkları		
TRAPS	TNFRSF1A (12p13)	TNFRSF1A(TNFR11,p55, CD120a)
Spondiloartropatiler	Kompleks	
	HLA-B(16p21.3)	HLA-B27
	ERAP1 (5q15)	ERAP1 (ARTS1)
Tip 4: Kompleman Hastalıkları		
HUS	CFH(1q32)	Kompleman Faktörü H
	MCP (1Q32)	MCP (CD46)
	CFI (4q25)	Kompleman Faktör I
	CFB (6p21.3)	Kompleman Faktör B
	Kompleks	Otoantikörler
AMD	Kompleks	
	CFH (1q32)	Kompleman Faktörü H
Tip 5: Sitokin Sinyal Hastalıkları		
Cherubism protein 2	SH3BP2 (4p16.3)	SH3-bağlayıcı

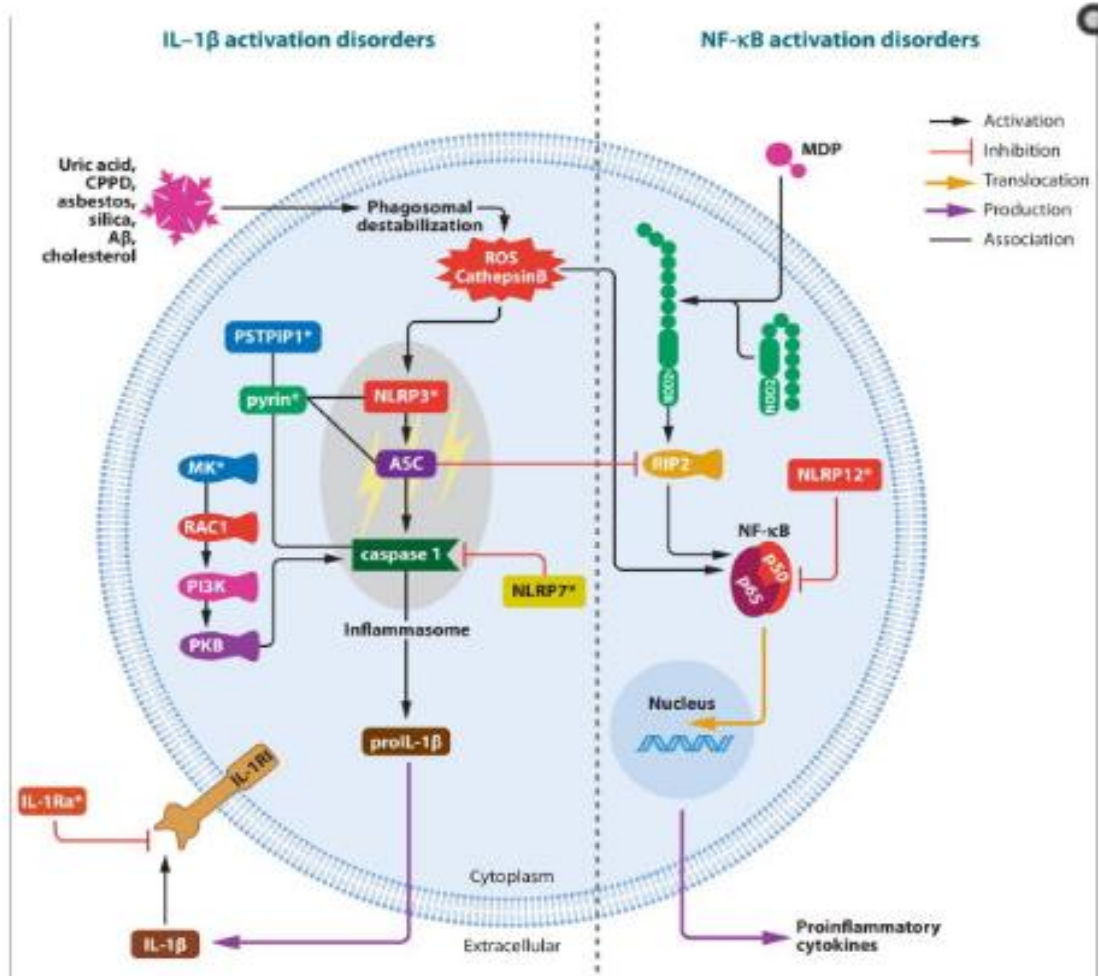
Tip 6: Makrofaj Aktivasyonu		
Familial HLH	UNC13D (17q21.1)	Munc13-4
	PRFI (10q22)	Perforin 1
	STXI 1 (6q24.2)	Syntaxin 11
	Kompleks	Virüs
Chediak-Higashi Sendromu	LYST (1q42.3)	LYST (CHS1)
Griscelli Sendromu	RAB27A (15q21.3)	RAB27A
X'e Bağlı Lenfoproliferatif Sendrom	SH2DIA(Xq25)	SAP
Hermansky-Pudlak Sendromu	HPSI-8	HPSHPS1-8I-8
Sekonder HLH	Kompleks	
Aterosklerozis	Kompleks	Kolesterol

En baştan belirtilmemiştir ki, McGonagle & McDermott (180) tarafından da belirtildiği gibi, kendiliğinden reaktif immünolojik hastalığın spektrumu, temelde lezyon bazlı otoimmün bozuklukları ve temelde doğal bağışıklık sisteminden kaynaklanan otoinflamatuvar koşulların arasında bir süreklilik olduğunu gösterir.

Özellikle genetik olarak kompleks bozukluklarda, bağışıklık sisteminin her iki kolundaki, kendinden genişleme ihtimali olan döngüleri ile çoklu lezyonlar olması ihtimali yüksektir. Yukarıdaki tartışmaya uygun olarak, tabloda birinci tip otoinflamatuvar hastalıklar IL-1 β inflamazomopatilerdir ve IL-1 β aktive eden makromoleküler kompleks bozuklukları olarak tanımlanırlar. Bunun prototipleri NLRP3 tarafından(etrafında) çekirdektaşırler, ama ilgili bir dizi protein kompleksini de içerebilirler.

İçsel inflamazomopatiler, komplekslerin içindeki bileşen proteinlerin moleküler lezyonlarını gösterirken, dışsal inflamazomopatiler inflamazomu çeşitli yukarı ve aşağı doğru düzenleyici elementlerin bozukluklarına işaret ederler (inhibitör ya da aktivatör).

IL - 1 β , inflamazom, doğal bağışıklık ve ilgili insan hastalıkları hakkındaki anlayışımızda önemli bir kavramsal gelişme de olsa, doğal bağışıklığın tek moleküler motoru olduğu söylenemez. Tablo2.9’da Crohn Hastalığı (CH) ve Blau sendrom (BS) gibi ikinci tip otoinflamatuvar hastalıklar olarak önerilen hastalıklar, kısmen NOD2/CARD15 sekans değişkenlerinden kaynaklanır. IL - 1 β her iki hastalıkta da inkar edilemez bir rol oynasa da, NOD2/CARD15 proteini, hücre içi mikrobik ürünlere tepki olarak NF- κ B aktivasyonunda merkezi bir rol oynar. Doğal ve adaptif bağışıklık arasındaki etkileşimi vurgulayan granülomlar her iki bozuklukta da belirgin olarak görülür.



Şekil2.9: IL-1 β (inflamazomopatiler) ve NF- κ B tarafından duzenlenen otoinflamatuvar hastaliklariin mekanizması:

NLRP3 proteini ASC ve caspase-1 ile etkileşip inflamazom adlı bir kompleks olusturur. Bu, IL-1 β 'i aktif haline çeviren makromlekuler bir komplekstir. Bu kompleksin fonksiyonunu etkileyen pyrin, PSTPIP1, mevalonate kinase (MK), ve NLRP7 gibi proteinlerdeki mutasyonlar böylelikle harici inflamazomopatileri ifade eder. NLRP3'deki mutasyonlar açıkça bu molekülü aktive ederler; fakat pyrin ve PSTPIP1 mutasyonlarının inflamazom'u duzenlemedeki kesin mekanizmaları hala belirlenememiştir. IL-1 β üretiminin negatif duzenleyicisi NLRP7 olduğundan, bu mutasyonlar proteini inaktif hale getirmeye meyillidir. Her ne kadar MK mutasyonlarından Rac1/PI3K/PKB aktivasyonuna giden yol hala formel olarak tanımlanmamış olsa da, bu mutasyonların da fonksiyon kaybı olduğu gösterilmiştir. IL-1 reseptor antagonistindeki (IL-1Ra) mutasyonların diğeri bir harici inflamazomopati'ye sebep olduğuna işaret etmektedir. NF- κ B aktivasyon bozukluklarında, molekülün kendini baskılamasını hafifleten mutasyonlar tarafından NOD2 aktive ediliyor olabilir. Bununla birlikte mutasyonların, konağı bakteriyel hücre duvarı bileşeni muramyl dipeptide (MDP)'ye karsi tolerize eden proteini inaktif hale getirdiğine dair sağlam veriler de bulunmaktadır. NLRP12, NF- κ B'nin negatif duzenleyicisidir ve böylelikle proinflamatuvar bir hastalığa, fonksiyon-kaybı mutasyonları sebep oluyor gibi görünmektedir (1).

Kullanılan kısaltmalar: CPPD, calcium pyrophosphate dihydrate; A β , amyloid- β ; ROS, reactive oxygen species; PKB, protein kinase.

Görünür bir neden olmadan tekrarlayan inflamasyon atakları, aşikar bir otoimmün patolojinin yokluğu (yüksek titrede patojenik otoantikorların yokluğu ve Antijene-özgü otoreaktif T hücrelerinin yokluğu) anormal artmış inflamatuvar yanıtı neden olan, büyük oranda doğal bağışıklık hücre ve moleküllerine bağlı olarak gelişen, önemli oranda konağı bağlı yatkınlığın söz konusu olduğu otoinflamatuvar hastalıkların moleküler patofizyolojisine dayanan ,masters ve arkadaşlarının yaptığı bu sınıflamanın ilk iki sınıfı dışındaki otoinflamatuvar hastalık sınıflarının bilinen

moleküler patofizyolojisi araştırmamızla yakından ilgili olmadığından burada ayrıntılı anlatılmayacaktır.

Bu hastalıkların inflamatuvar belirtilerinin tamamen sebepsiz olduğu fikri elbette göreceli bir durum, nitekim psikolojik stres, travma, aşılarda soğuga maruz kalma, ve diyet bozuklukları gibi pek çok faktör bu hastalıkların bazılarını tetikleyebilir. Ama bütün vakalarda, otoinflamatuvar adlandırması, önemli bir konak tercihini örtülü olarak da olsa ortaya koyar.

Çevresel faktörleri incelerken, son zamanlarda gen regülasyonunda tanımlanan bir grup mekanizmanın önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörleri DNA dizilerine bağlanarak, gen aktivasyonu ya da susturuculuğundan sorumludurlar. Epigenetik modifikasyonlar DNA dizisini etkilemez, çünkü bu değişiklikler temelde alta yatan toksinler, enfeksiyonlar, ilaç veya diyet gibi çevresel etkileri ve esneklik potansiyelini gösterirler. Epigenetik mekanizmalar gen regülasyonu için gereklidir ve epigenetik işaretlerdeki değişiklikler örneğin, sitokin genleri, antiinflamatuvar sinyallerde sistemik inflamasyon yanıtı ve AID (otoinflamatuvar hastalık) sonuçlanan bir dengesizliğe yol açabilir (181).

2.3.5. MEFV Geni nin FMF dışı Hastalıklarla İlişkisi

Diğer hastalıklarla FMF arasındaki bağlantıları araştıran çalışmalar vardır. FMF hastalığında ataklar arasında subklinik inflamatuvar bir sendrom olduğu kanıtlanmıştır. Bu biyolojik sendrom yüksek ESR (182,183) ve yüksek CRP (C Reaktif Protein) düzeylerini içerir (184). Dahası asemptomatik taşıyıcı denilen heterozigot bireylerde de CRP yüksekliği gösterilmiştir (184, 185, 186, 187).

2.3.5.1.FMF ile ilişkili hastalıklar

Vaskülütlerin şu üç formu FMF ile kesinlikle ilişkilidir. Polyarteritis Nodosa (PAN), Microscopic Polyangiitis ve Henoch-Schonlein Purpurası (188).

2.3.5.2-FMF ile muhtemelen ilişkili hastalıklar

2.3.5.2.1 Behçet Hastalığı

FMF ve Behçet Hastalığı (BD) inflamatuvar hastalıklar olup; Ortadoğu ve Akdeniz toplumlarında sık olarak görülürler. Epidemiyolojik olarak aynı bölgelerde görülen bu iki hastalıkta, MEFV mutasyonları incelenmiştir. Sonuçta Behçet hastalarında M694V ve V726A mutasyonlarının normal sağlıklı kontrollere göre daha yüksek oranda bulundukları belirlenmiştir (189).

2.3.5.2.2 Romatoid Artrit

Romatoid artrit (RA), el ve ayak eklemleri olmak üzere birçok eklemi simetrik olarak tutan, eklemlerde ileri derecede şekil bozukluğuna ve hareket kısıtlanmasına yol açan kronik inflamatuvar bir hastalıktır (190). Romatoid Artrit'de E148Q mutasyonunu heterozigot olarak taşımak amiloidoz oluşumunu yaklaşık 7 kat; homozigotluk durumunda ise 12 kat risk oluşturmaktadır (191).

2.3.5.2.3 Multiple Skleroz

Askenazi olmayan Yahudi multiple skleroz hastalarında MEFV genindeki mutasyonların, hızlı dejenerasyon riskini arttırdığı bildirilmiştir (192).

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Kliniğinde takip ve tedavisi düzenlenen, radyolojik, endoskopik ve klinik özellikleri temel alınarak crohn hastalığı veya ülseratif kolit tanısı almış toplam 100 hasta ile 20 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışma için seçildi. Çalışmanın içeriğini anlatan onam formu ile bilgilendirilip olur alınarak çalışmaya dahil edildi. Takip süresi bir yıldan az olan hastalar çalışmada değerlendirilmedi.

Kontrol grubu inflamatuvar barsak hastalığı, FMF ve sistemik otoinflamatuvar hastalıklar yönünden detaylı sorgulandı. Hastaların klinik ve demografik özellikleri bir anamnez formu ile değerlendirildi. Hastalık lokalizasyon sınıflandırmalarında Viyana hastalık sınıflamasının Montreal modifikasyonu kullanıldı (77).Tedavi gereksinimleri ve sık tekrarlayan hastalık olup olmadıkları ECCO (European Crohn's and Colitis Organisation) klavuzu esas alınarak kaydedildi ve hastalık şiddeti değerlendirildi Daha sonra hastalar UK ve Crohn olarak iki gruba ayrıldı. İki grup hasta da, hastalığın başlangıç yaşı, süresi, hastalık lokalizasyonları, steroid, immun modülatör biyolojik ajan kullanımı gereklilikleri, cerrahi gereksinimleri ve extraintestinal bulgularına göre sınıflandırıldı.

3. 2. Metod

Çalışmaya kabul edilen tüm hastaların tam kanlarından DNA izolasyonu yapılmasının ardından MEFV geninin 2. ve 10. ekzon bölgeleri PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltıldı. Sanger DNA dizi analizi yöntemi ile çoğaltılan ampliconların nükleotid dizileri belirlenerek genetik varyantlar saptandı.

3.2.1.Genomik DNA izolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan bireylerden 1 cc 0,5M Etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüp içerisine 2 cc kan örneği alındı. QIAMP DNA Blood Mini Kit (Cat. No: 51104,Qiagen, Almanya) kullanılarak EDTA lı tüplere alınmış tam kan örneklerinden Genomik DNA izolasyonu yapıldı. Periferik

kan lökositlerinden standart prosedüre göre DNA izolasyonu yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce örnek sayısına yetecek kadar Elution Buffer ependorf tüpüne kondu ve termomikser de 56°C ye kadar ısıtıldı. 1,5 ml'lik ependorf tüpüne 20 µl Proteinaz K, 200 µl kan örneği ve 200 µl lizis Buffer A kondu. Kapağı kapatılarak tüp kısaca vortekslendi. Lizis aşaması için termomikserde 56°C'de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Tüpe 400 µl Binding Buffer eklendi ve 10 sn vortekslendi. Kısa bir santrifüj yapılarak sıvının tamamı Spin filtreli tüpe aktarıldı. 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12 000 rpm de 2 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirilerek, filtre üzerine 500 µl Wash Buffer I eklendi ve 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü tekrar değiştirildi, filtre üzerine 800 µl Wash Buffer II eklendi ve 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Filtre boş toplama tüpüne aktarıldı ve alkolün uzaklaşması için maksimum hızda 4 dk santrifüj edildi. Filtre temiz 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve alkolün tamamen uzaklaşması için 3 dk kapak açık biçimde oda sıcaklığında bekletildi. Filtre membranının tam ortasına önceden ısıtılmış 56C'deki Elution Buffer-D'den 200 µl eklendi. 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Filtre atılarak, ependorf içindeki ekstrakt alındı ve -20 °C de saklandı.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR (polimeraz chain rection), hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda, konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır. Yani, bir çeşit *in vitro* klonlamadır (193).

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için az miktarda DNA yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi ait bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz, deoksinükleotid trifosfatları (dNTP) kullanarak çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak

maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl) ayrıca önemli bir kofaktör olan Mg^{+2} iyonları gereklidir (193).

PCR reaksiyonu, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasına (denatürasyon), sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasına (hibridizasyon), daha da sonra zincirin uzamasına (polimerizasyon) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım bir PCR siklusunu oluşturur ve çoğaltılmış ürünün miktarı teorik olarak, bu üç temel basamağın tekrarlanma sayısına bağlıdır. Yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve çok kez tekrar edilir. İşlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanmak üzere bol miktarlarda hedef DNA parçaları elde edilir (193). İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir.

Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar 90-95°C'de yaklaşık 5 dakika süreyle tek zincirli hale gelinceye kadar ısıtılır. Sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar. DNA polimeraz reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70-75 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (193).

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. DNA polimerazın iyi çalışabilmesi en etkin olduğu pH'nın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerden birisidir. Bu amaçla genellikle Tris.HCl pH: 8,4 tepkime karışımında son değişimi 10 mM olacak şekilde kullanılır. PCR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50-60 mM düzeyinde K^{+} bulunmasının çoğaltılmayı önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Yine karışımında 100 µg/ml jelatin bulunmasının benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, serbest magnezyum ($MgCl_2$)

konsantrasyonun azalması ile Taq Polimeraz doğruluğu arttırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg+2 iyonunu bağladıklarından; her PCR protokolünde Mg+2 konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg+2, enzimin spesifikliğini azaltır, azı ise; enzimin inaktif olmasına yol açar (194).

PCR reaksiyonu ile hedeflenen bölge çoğaltılmaktadır. MEFV geni ekzon 2 ve 10 gen bölgelerinin sentetik oligonükleotidler kullanılarak aşağıdaki protokole göre Applied Biosystems 9700 marka thermal cycler cihazında polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı;

3.2.3. MEFV Ekzon 2 ve 10 PCR Protokolü

HelixAmp™ Ready-2x-MultiPlex (Ver. 2.0)	20 ul
<i>(Cat no MU001S, Nanohelix Ltd, Sout Korea)</i>	
Ekzon 2/10 Forward Primer (10 pmol)	1 ul
Ekzon 2/10 Reverse Primer (10 pmol)	1 ul
5X Tune Up GC Rich Solution	1 ul
DNA (yaklaşık 50 ng)	1 ul

96 C	10 dakika	} 35 döngü
94 C	45 saniye	
61 C	50 saniye	
72 C	60 saniye	
72 C	7 dakika	
4 C	sonsuz	

Primerler ;

Ekzon 2 forward : 5'-CTAAACGTGGGACAGCTTCATC -'3

Ekzon 2 reverse :5'-AAGCGCTGGGATTACAGGCATGA -'3

Ekzon 10 forward : 5'-CCAGAAGAACTACCCTGTCCC -'3

Ekzon 10 reverse :5'-TCCTCCTCTGAAATCCATGG -'3

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Sigma, ABD) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Biz bu çalışmamızda PCR ürünlerini %2'lik agaroz jelde değerlendirdik. %2'lik agaroz jel için 1,5 g agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 75 ml'ye tamamlandı. TBE 1X TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanır. TBE 5X solüsyonu 54 g Trizma® (Sigma, ABD), 27,5 g Borik asit (Carlo Erba,İtalya), 20 ml 0,5 M EDTA (Sigma, ABD) ve deiyonize su (ddH₂O) ile 1 l'ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromid'in (Sigma, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 2'şer µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanır. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 18 µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 3 µl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılır ve jellere yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD) PCR ürünleriyle birlikte jele 2 µg kadar yüklenir. 90-100 V akımda 20 dk kadar yürütülür (Wealtec, Tayvan). Ultraviyole ışıktaki (Spectroline, ABD) DNA bantları incelenerek 2. ve 10. ekzon gen bölgeleri PCR ürünlerinde amplifikasyonun olup olmadığına karar verildi.

3.2.5. PCR Pürifikasyonu

PCR ürününün temizlenmesi genin dizileme başarısını etkilemektedir. PCR reaksiyonu sırasında ortamda amplifikasyon ürünlerinin yanısıra tepkimeye girmemiş primerler, dNTP'ler ve tuzlar bulunur. PCR ürünlerinin temizlenmesiyle bu yan ürünler uzaklaştırılır. DNA dizi analizi için amplifikasyon ürünlerinin temizlenmesin Exo SAP-IT for PCR Product Cleanup (Cat. No 78200, Affymetrix) kiti kullanılarak enzimatik olarak aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi. PCR pürifikasyonu için Applied Biosystems 9700 marka thermal cyclers cihazı kullanıldı.

Exo SAP-IT	2 ul
PCR ürünü	5 ul
37 C	30 dakika
80 C	15 dakika
4 C	sonsuz

3.2.6. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Bunun için iki temel teknik geliştirilmiştir. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (193,194).

Sanger DNA dizi analizi yöntemi: Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz ile kataliz edilir. Yöntemde, kimyasal değişikliğe uğratılmış dideoksinükleotid trifosfatlar (ddNTP) kullanılarak bir dizi DNA parçacıkları elde edilir. ddNTP'nin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmaz. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA

zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleosid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleosid kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak, bir dizi DNA parçacığı meydana gelir. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir (193,194).

Bu yöntem, rekombinant Taq polimerazların geliştirilmesiyle PCR ile de gerçekleştirilebilir hale gelmiştir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA örneği, polimeraz enzimi, oligonükleotid primer, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışması için tampon görevi görecektir olan maddeler bulunur. PCR’da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (193,194).

Genomların dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi aletleri, radyoaktif izotoplar yerine de floresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılarak dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (193,194).

Otomatik DNA dizi analizi reaksiyonu, “ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 CycleSequencing Kit” (Applied Biosystems, USA) reaksiyon kiti ile üretici firmanın öngördüğü koşullar doğrultusunda aşağıda verildiği şekilde yapıldı. Bu kitin özelliği, içeriğinde tüm PCR kimyasalları ile beraber, flöresan boyalı ddNTP’ler ve Taq DNA Polimeraz enziminin tek bir karışım halinde bulunmasıdır. “Big Dye Ready Reaction Mix”olarak adlandırılan bu karışıma sadece primer ve temizlenmiş kalıp DNA (PCR ürünü) eklenir ve reaksiyon başlatılır Reaksiyon tüpleri pipetlenerek karıştırıldı ve thermal cycler cihazına yüklenerek, aşağıdaki program 25 döngü halinde uygulandı PCR için Applied Biosystems 9700 marka thermal cycler cihazı kullanıldı.

Big Dye Ready Reaction Mix	3 ul
Forward/Reverse Primer (5 pmol)	1 ul
ddH ₂ O	4 ul
PCR Purifikasyon ürünü	2 ul

96 C	1 dakika	
96 C	10 saniye	} 25 döngü
50 C	5 saniye	
60 C	4 dakika	
4 C	sonsuz	

PCR ürününün temizlenmesi genin dizileme başarısını etkilemektedir. PCR reaksiyonu sırasında ortamda amplifikasyon ürünlerinin yanısıra tepkimeye girmemiş pirimerler, dNTP'ler ve tuzlar bulunur. PCR ürünlerinin temizlenmesiyle bu yan ürünler uzaklaştırılır. DNA dizi analizi için amplifikasyon ürünlerinin temizlenmesinde ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research,USA) kiti kullanıldı.. Bu aşama özellikle reaksiyona girmemiş flöresan boyalı ddNTP'lerin uzaklaştırılması açısından önem taşımaktadır. İşlem uygun şekilde yapılamazsa kontaminant boyalar lazer tarafından okunmakta ve analizin hassasiyetini bozmaktadır. Purifiye edilen pcr ürünleri ABI 3130xl Genetic Analyser otomatik kapiller elektroforez cihazında, POP7 polimer kullanılarak 45 dakika süre ile elektroforez yapıldı. Elde edilen örneklere ait DNA dizileri Seqscape v2.6 programı kullanılarak analiz edildi. Cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar aracılığı ile sonuçlar pikler şeklinde görüntülenmiştir.

3.2.7 İstatistiksel Değerlendirme

Tüm istatistiksel analiz SPSS 16.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler frekans (%), medyan (kartiller arası fark) veya ortalama (std. sapma) olarak hesaplandı. Sınıflayıcı değişkenlerin birbirleriyle ilişkisini incelemek için ki-kare testi uygulandı. Gen mutasyonlarının hastalık başlangıç yaşı ile ilişkisi Mann Whitney U Testi ile sınılandı. Klinik özelliklere etki eden MEFV gen mutasyonuna ait varyasyonların bir arada etkilerini incelemek için lojistik regresyon kullanıldı. Allel frekanslarının karşılaştırılmasında iki oran t testinden yararlanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Betimleyici İstatistikler

Çalışmaya kabul edilen 55 Ülseratif Kolit (27 kadın, 28 erkek), 45 Crohn Hastası (23 kadın, 22 erkek) toplam 100 hasta ve 20 sağlıklı kontrolün (10 kadın, 10 erkek) demografik ve klinik özellikleri tabloda özetlenmiştir. Crohn hastalarından birine FMF, birine çöliak hastalığı, birine psöriasis ve romatoid artrit, ülseratif kolit hastalarından birine ise sistemik lupus eritematozis eşlik etmekteydi.

Tablo 4.1: Çalışma gruplarının demografik özellikleri

	ÜK (n=55)	CH (n=45)	KONTROL (n=20)
Demografik Özellikler			
Yaş (Ortalama ±SD)	45.2±14	43.6±14.0	37.4±13
Hastalık Yaşı (Yıl, Median)	5 (7)	4(8)	
Hastalık başlangıç yaşı (Ortalama ±SD)	38.4 ±14.6	37.5 ± 13.9	
ÜK lokalizasyonu (n,%)			
Proktit	2 (3.6)		
Sol kolit	18 (32.7)		
Extensif Kolit	35 (63.6)		
CH lokalizasyonu (n,%)			
İleal		15 (33.4)	
Kolonik		1 (2.2)	
İleokolonik		29 (64.4)	
Üst GİS		0	
CH Davranış Biçimi (n,%)			
İnflamatuvar		23(51.1)	
Fibrotik		8(17.8)	
Fistülizan		14(31.1)	
Perianal Hastalık		12(26.7)	

Hastalık Paterni		
Remisyon (n,%)	46(83.6)	41 (91.1)
Aktif (n,%)	9 (16.4)	4 (8.9)
Sık tekrarlayan hastalık (n,%)	19(34,5)	26(57,7)
Steroid ihtiyacı (n,%)	30(54,5)	34(75,5)
İmmün modölatör kullanım gerekliliği (n,%)	26(47,2)	37(82,2)
Biyolojik ajan kullanım gerekliliği (n,%)	10(18,1)	20(44,4)
Cerrahi gereksinim (n,%)	5(11)	14(31)
Ekstraintestinal Bulgu (n,%)		
Artrit	4 (7.2)	7(15.6)
Pyoderma Gangrenosum	1 (1.8)	0
Tromboembolik Olay	1 (1.8)	0
Ankilozan spondilit	1 (1.8)	2(4.4)
Yok	48(87.4)	36(80)

4.2. Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalarında MEFV Genindeki Mutasyon Sıklıklarının Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grubu olarak alınan bireylerin her birinin MEFV geninin 2. Ve 10.exonlarının DNA dizi analizi sonucu bulunan varyant tipleri tablo 4-2 ve tablo 4-3 de gösterilmektedir.

Tablo 4.2: Hastalarda MEFV 2.ve 10.exonda saptanan sekans varyantları

Genel İsim	HGVS protein ismi	HGVS sekans ismi/ Baz değışikliği*	rs Sayısı/ dbSNP#
#D102D	p.(=)	c.306T>C	rs224225
#G138G	p.(=)	c.414A>G	rs224224
#A165A	p.(=)	c.495C>A	rs224223
R202Q	p.Arg202Gln	c.605G>A	rs224222
E148Q	p.Glu148Gln	c.442G>C	rs3743930
M694V	p.Met694Val	c.2080A>G	rs61752717
R761H	p.Arg761His	c.2282G>A	rs104895097
V726A	p.Val726Ala	c.2177T>C	rs 28940579
M680IGC	p.Met680Ile	c.2040G>C	rs28940580
M694I	p.Met694Ile	c.2082G>A	rs28940578
K695R	p.Lys695Arg	c.2084A>G	rs104895094
R628K	p.Arg628Lys	c.1883G>A	
R241T		yeni	
Del İtron 12912 G		yeni	

infervers veri tabanında polimorfizm olarak açıklanmaktadır

(<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/search.php>),

* cDNA'yı kodlayan sekansa göre başlatıcı ATG'nin A nükleotidinden itibaren +1 ile sayılmaya başlanır (Reference sequences Chr.16p13.3; GenBank NM_000243 NM_000243 (MEFV)), +rs: Referans sekans, # dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), p.(=) Aynı protein, HGVS: Human Genome Variation Society

Tablo 4.3: Kontrol grubunda MEFV 2.ve 10.exonda saptanan sekans varyantları

Genel İsim	HGVS protein ismi	HGVS sekans ismi/ Baz	rs Sayısı/ dbSNP#
‡D102D	p.(=)	c.306T>C	rs224225
‡G138G	p.(=)	c.414A>G	rs224224
‡A165A	p.(=)	c.495C>A	rs224223
R202Q	p.Arg202Gln	c.605G>A	rs224222
E148Q	p.Glu148Gln	c.442G>C	rs3743930
M694V	p.Met694Val	c.2080A>G	rs61752717
M680IGC	p.Met680Ile	c.2040G>C	rs28940580
‡S683S	p.(=)	c.2049G>A	rs104895092
‡P706P	p.(=)	c.2118G>A	rs2234939
S179N	p.Ser179Asn	c.536G>A	YOK

‡ infervers veri tabanında polimorfizm olarak açıklanmaktadır

(<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/search.php>),

* cDNA'yı kodlayan sekansa göre başlatıcı ATG'nin A nükleotidinden itibaren +1 ile sayılmaya başlanır (Reference sequences Chr.16p13.3; GenBank NM_000243 NM_000243 (MEFV)), +rs: Referans sekans, # dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), p.(=) Aynı protein, HGVS: Human Genome Variation Society

MEFV geni 2. Ve 10. Exonda inframes veri tabanında polimorfizm olarak açıklanan mutasyonlar dahil ÜK hastalarının %73'ünde, Crohn hastalarının %67 sinde ve kontrollerin %55'inde değişim görüldü.). Mutasyonların homozigot ve heterozigot değişim sıklıkları tablo 4.4 ve 4.5 da özetlenmiştir.

Tablo 4.4: FMF kriteri olan mutasyonların sıklığı ve değişim tipleri

	UK (n=55)		CH (n=45)		TOPLAM (n=100)	
	n	%	n	%	N	%
Mutasyon Yok	47	85.5	33	73.3	80	80.0
Heterozigot	8	14.5	8	17.8	16	16.0
Compound Heterozigot	0	0	2	4.4	2	2.0
Homozigot	0	0	2	4.4	2	2.0

Tablo 4.5: Hastalık gruplarında mutasyon tiplerinin homozigot ve heterozigot sıklıklarının değerlendirilmesi

	UK (n=55)		CH (n=45)		TOPLAM (n=100)	
	N	%	n	%	n	%
E148Q						
Heterozigot	4	7.3	2	4.4	6	6.0
Homozigot	0	0.0	0	0.0	0	0.0
M694V						
Heterozigot	1	1.8	4	8.9	5	5.0
Homozigot	0	0.0	1	2.2	1	1.0
R761H						
Heterozigot	0	0.0	1	2.2	1	1.0
Homozigot	0	0.0	0	0.0	0	0.0
V726A						
Heterozigot	1	1.8	2	4.4	3	3.0
Homozigot	0	0.0	0	0.0	0	0.0
M680I						
Heterozigot	0	0.0	2	4.4	2	2.0
Homozigot	0	0.0	0	0.0	0	0.0

M694I

Heterozigot	0	0.0	0	0.0	0	0.0
-------------	---	-----	---	-----	---	-----

Homozigot	0	0.0	1	2.2	1	1.0
-----------	---	-----	---	-----	---	-----

K695R

Heterozigot	1	1.8	1	2.2	2	2.0
-------------	---	-----	---	-----	---	-----

Homozigot	0	0.0	0	0.0	0	0.0
-----------	---	-----	---	-----	---	-----

R628K

Heterozigot	1	1.8	0	0.0	1	1.0
-------------	---	-----	---	-----	---	-----

Homozigot	0	0.0	0	0.0	0	0.0
-----------	---	-----	---	-----	---	-----

Polimorfizmler dahil varyant sıklığında hasta grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu. Bu mutasyonlardan polimorfizmler ve yeni saptanan varyantlar hariç, FMF kliniği ile ilişkilendirilenlerin oranı, ÜK de %14,5, CH da ise %26.7 idi. ÜK ve CH grubunun kontrol grubu ile mutasyon sıklığının anlamlı ölçüde farkı olmadığı saptandı (tablo 4.6). Polimorfizmlerin ve mutasyonların her birinin, ayrı ayrı sıklıkları incelendiğinde hasta grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p>0,05$). Ülseratif kolit, crohn hastaları ve kontrol hastalarında ortak görülen mutasyonlar için allel frekansı farklı değildi (Tablo 4.7 ,tablo 4.8).

Crohn hastası erkeklerde D102D, G138G, A165A ve R202Q polimorfizmlerin varlığı kadınlardan anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.020$).

Tablo 4.6: FMF kliniği ile ilişkili mutasyonların hasta ve kontrol grubunda değerlendirilmesi.

	MUTASYON YOK		MUTASYON VAR		p
	n	%	n	%	
UK	47	85.5	8	14.5	1.000
Kontrol	17	85.0	3	15.0	
CH	33	73.3	12	26.7	0.359
Kontrol	17	85.0	3	15.0	
Hasta	80	80.0	20	20.0	0.762
Kontrol	17	85.0	3	15.0	

Tablo 4.7: ÜK hastaları ile Kontrol grubu arasında allel frekanslarının incelenmesi

	UK	Kontrol	
	Allel %	Allel %	p
E148Q	3.6	2.5	0.793
M694V	0.9	2.5	0.670
M680I	0.0	2.5	0.476

Tablo 4. 8: Crohn hastaları ile kontrol grubu arasında allel frekanslarının incelenmesi

	CH	Kontrol	
	Allel %	Allel %	p
E148Q	2.2	2.5	0.946
M694V	6.7	2.5	0.417
M680I	2.2	2.5	0.946

4.3. Tüm İBH'da (Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalarında) Mutasyonların Klinik Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

FMF kliniği ile ilgili herhangi bir mutasyon varlığının tüm İBH hastalarının hastalık paternine etkisi değerlendirildi. Steroid gerekliliği, immun modülatör gerekliliği, biyolojik ajan gerekliliği mutasyon taşıyan ve taşımayan hastalar arasında farklı görülmezken, cerrahi gereksinim mutasyon taşıyan grupta anlamlı ölçüde fazlaydı ($p<0.05$) (Tablo 4.9). Tüm hastalarda herhangi bir mutasyon tipi ile cerrahi gereksinim arasındaki bağlantı incelendiğinde bir ilişki bulunmadı (Tablo 4.10). Tüm hastalarda FMF ilişkili mutasyonların hep birlikte, klinik ölçülere etkisi lojistik regresyon ile değerlendirildi. Steroid, immunomodulator ve biyolojik gereksinimi ile sık tekrarlayan hastalıkta her hangi bir anlamlı modele ulaşılamazken, cerrahi gereksinimi açıklamada E148Q ($p=0.036$) ve M694V ($p=0.036$) bir arada anlamlı bulundu. E148Q mutasyonun varlığı cerrahi gereksinimi 6.25 (%95 güven aralığı:

1.13-34.64) kat arttırırken, benzer şekilde M694V mutasyonun varlığı cerrahi gereksinimi 6.25 (%95 Güven aralığı: 1.13-34.64) kat arttırmaktaydı (Tablo 4.11).

Tablo 4.9: Tüm hastalarda MEFV gen mutasyonu varlığının klinik parametrelere etkisinin değerlendirilmesi

	MUTASYON YOK		MUTASYON VAR		
	n	%	n	%	p
CERRAHİ GEREKSİNİM					
Evet	11	13.8	8	40.0	0.021
Hayır	69	86.3	12	60.0	
STEROID GEREKSİNİM					
Evet	51	63.8	13	65.0	0.917
Hayır	29	36.3	7	35.0	
İMMUNMODULATOR GEREKSİNİMİ					
Evet	49	61.3	14	70.0	0.468
Hayır	31	38.8	6	30.0	
BİYOLOJİK AJAN GEREKSİNİMİ					
Evet	23	28.8	7	35.0	0.585
Hayır	57	71.3	13	65.0	
SIK TEKRARLAYAN HASTALIK					
Evet	33	41.3	12	60.0	0.132
Hayır	47	58.8	8	40.0	

Tablo 4.10: Tüm hastalarda cerrahi gereksinime mutasyon tipinin etkisinin değerlendirilmesi

	EVET		HAYIR		
	n	%	n	%	P
E148Q					
Mutasyon Yok	16	84.2	78	96.3	0.081
Mutasyon Var	3	15.8	3	3.7	
M694V					
Mutasyon Yok	16	84.2	78	96.3	0.081
Mutasyon Var	3	15.8	3	3.7	
M680I					
Mutasyon Yok	19	100.0	79	97.5	1.000
Mutasyon Var	0	0.0	2	2.5	
R761H					
Mutasyon Yok	18	94.7	81	100.0	0.190
Mutasyon Var	1	5.3	0	0.0	
V726A					
Mutasyon Yok	18	94.7	79	97.5	0.472
Mutasyon Var	1	5.3	2	2.5	

M694I					
Mutasyon Yok	19	100.0	80	98.8	1.000
Mutasyon Var	0	0.0	1	1.2	
K695R					
Mutasyon Yok	19	100.0	79	97.5	1.000
Mutasyon Var	0	0.0	2	2.5	
R628K					
Mutasyon Yok	19	100.0	80	98.8	1.000
Mutasyon Var	0	0.0	1	1.2	

Tablo 4.11: Cerrahi gereksinime etki eden MEFV Mutasyonlarının çok değişkenli analizi (Lojistik regresyon)

	B	Std.Hata	p	OR	%95 Güven aralığı	
					Alt	Üst
E148Q	1.833	0.874	0.036	6.25	1.128	34.639
M694V	1.833	0.874	0.036	6.25	1.128	34.639

Hastaların MEFV ninde mutasyon olup olmamasının İBH tanı yaşı üzerine etkisi değerlendirildi (Tablo 4.12). mutasyonu olan ÜK hastalarının tanı alma yaşı mutasyonu olmayanlardan farklı değildi. Benzer şekilde mutasyonu olan crohn hastalarında olmayanlardan tanı alma yaşı farklı değildi.

Tablo 4.12 MEFV geni mutasyon varlığının tanı yaşı üzerine etkisinin değerlendirilmesi

		n	Ortalama	Std. Sapma	p
TOPLAM	Mutasyon Yok	80	38.3	15.3	0.210
	Mutasyon var	20	34.4	14.2	
ÜK	Mutasyon Yok	47	37.8	16.0	0.558
	Mutasyon var	8	36.0	18.0	
CH	Mutasyon Yok	33	39.1	14.5	0.253
	Mutasyon var	12	33.3	11.8	

4.4 MEFV Genindeki Mutasyonların Crohn Hastalığının Klinik Karakterine Etkisinin Değerlendirilmesi

MEFV geninde en az bir allelde mutasyon taşıyan crohn hastalarının klinik karakterlerinin taşımayanlara göre değişimi araştırıldı (Tablo 4.13, Tablo 4.14). Mutasyon varlığının crohn hastalarında hastalık lokalizasyonunu ve davranış biçimini değiştirmedeği gözlemlendi. Mutasyon taşıyanlarla taşımayanlar arasında perianal hastalık varlığı açısından da fark bulunmadı. Ayrıca bu iki grup crohn hastası arasında extraintestinal bulgu varlığı ya da sık tekrarlayan hastalık varlığı yönünden de fark saptanmadı (Tablo 4.13). Taşıyıcı olan ve olmayan hastalar da tedavi gereksinimleri açısından fark gözlenmedi (Tablo 4.14).

Tablo 4.13: Crohn hastalarında herhangi bir mutasyon varlığının hastalık parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi

	MUTASYON YOK		MUTASYON VAR		p
	n	%	n	%	
CH LOKALİZASYONU					
İleal	10	30.3	5	41.7	0.496
Diğer	23	69.7	7	58.3	
CH DAVRANIŞ BİÇİMİ					
Fibrotik	5	15.2	3	25.0	0.661
Diğer	28	84.8	9	75.0	
CH DAVRANIŞ BİÇİMİ					
Fistülizan	11	33.3	3	25.0	0.725
Diğer	22	66.7	9	75.0	
PERİANAL HASTALIK					
Evet	9	27.3	3	25.0	1.000
Hayır	24	72.7	9	75.0	
EKSTRA İNTESTİNAL BULGU					
Yok	27	81.8	9	75.0	0.682
Var	6	18.2	3	25.0	

Tablo 4.14: Crohn hastalarında herhangi bir mutasyon varlığının klinik parametrelere etkisinin değerlendirilmesi

	MUTASYON YOK		MUTASYON VAR		
	n	%	n	%	p
CERRAHİ GEREKSİNİMİ					
Evet	9	27.3	5	41.7	0.470
Hayır	24	72.7	7	58.3	
STEROİD GEREKSİNİMİ					
Evet	24	72.7	10	83.3	0.699
Hayır	9	27.3	2	16.7	
İMMUNMODULATOR GEREKSİNİMİ					
Evet	26	78.8	11	91.7	0.419
Hayır	7	21.2	1	08.3	
BİYOLOJİK AJAN GEREKSİNİMİ					
Evet	14	42.4	6	50.0	0.651
Hayır	19	57.6	6	50.0	
SIK TEKRARLAYAN HASTALIK					
Evet	17	51.5	9	75.0	0.158
Hayır	16	48.5	3	25.0	

4.5 MEFV Genindeki Mutasyonlarının Ülseratif Kolit Hastalarının Klinik Özellikleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

ÜK hasta grubunda Exon 2 ve 10 da mutasyon taşıyan hastalarla taşımayan hastalar karşılaştırıldı. Hastalık lokalizasyonu proktit olan hasta sayısı istatistik değerlendirme için yeter sayıda veri oluşturmadığı için -Sol kolit- grubuna eklendi. Mutasyon taşıyan grubun taşımayan gruba göre lokalizasyon ve extraintestinal bulgu sıklığında fark gözlenmedi (Tablo 4.15).

Hastaların tedavi gereksinimleri ile mutasyon varlığı ilişkisi değerlendirildi. ülseratif kolit hasta grubunda cerrahi gereksinimin mutasyon taşıyan grupta taşımayanlara göre anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Tablo 4.16).

Cerrahi gereksinimin özellikle bir mutasyon tipi ile değişip değişmediği incelendi. ÜK'li hastalarda cerrahi gereksinim E148Q mutasyonu taşıyan hastalarda, taşımayan hastalara göre anlamlı ölçüde farklıydı (Tablo 4.17).

Ayrıca Ülseratif kolitli hastalarda D102D polimorfizmi biyolojik ajan gereksinimini, bu polimorfizm olmayanlardan farklı bulundu ($p<0.042$).

Tablo 4.15: ÜK hastalarında MEFV geni mutasyon varlığının hastalık parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi

	MUTASYON YOK		MUTASYON VAR		
	n	%	n	%	P
UK LOKALİZASYONU					
Ekstensif Kolit	30	63.8	5	62.5	1.000
Sol kolit	17	36.2	3	37.5	
EKSTRA İNTESTİNAL BULGU					
Yok	41	87.2	7	87.5	1.000
Var	6	12.8	1	12.5	
SIK TEKRARLAYAN HASTALIK					
Evet	16	34.0	3	37.5	1.000
Hayır	31	66.0	5	62.5	

Tablo 4.16: ÜK hastalarında MEFV geni mutasyon varlığının klinik Tedavi gereksinimlerine etkisinin değerlendirilmesi

		MUTASYON YOK		MUTASYON VAR		
		n	%	n	%	p
CERRAHİ GEREKSİNİMİ						
Evet		2	04.3	3	37.5	0.018
Hayır		45	95.7	5	62.5	
STEROİD GEREKSİNİMİ						
Evet		27	57.4	3	37.5	0.446
Hayır		20	42.6	5	62.5	
İMMUNMODULATOR GEREKSİNİMİ						
Evet		23	48.9	3	37.5	0.708
Hayır		24	51.1	5	62.5	
BIYOLOJİK AJAN GEREKSİNİMİ						
Evet		9	19.1	1	12.5	1.000
Hayır		38	80.9	7	87.5	

Tablo 4.17: Ülseratif kolit hastalarında bulunan MEFV gen mutasyonlarının herbirinin cerrahi gereksinim üzerine etkisi

	EVET		HAYIR		p
	n	%	n	%	
E148Q					
Mutasyon Yok	3	60.0	48	96.0	0.037
Mutasyon var	2	40.0	2	4.0	
M694V					
Mutasyon Yok	5	100.0	49	98.0	1.000
Mutasyon var	0	0.0	1	2.0	
M680I					
Mutasyon Yok	5	100.0	50	100.0	(-)
Mutasyon var	0	0.0	0	0.0	
R761H					
Mutasyon Yok	5	100.0	50	100.0	(-)
Mutasyon var	0	0.0	0	0.0	
V726A					
Mutasyon Yok	4	80.0	50	100.0	0.091
Mutasyon var	1	20.0	0	0.0	
M694I					
Mutasyon Yok	5	100.0	50	100.0	(-)
Mutasyon var	0	0.0	0	0.0	
K695R					
Mutasyon Yok	5	100.0	49	98.0	1.000
Mutasyon var	0	0.0	1	2.0	
R628K					
Mutasyon Yok	5	100.0	49	98.0	1.000
Mutasyon var	0	0.0	1	2.0	

(-) : İstatistik değerlendirme için yeter sayıda veri içermemekte olduğundan analiz yapılamadı.

5. TARTIŞMA

Crohn Hastalığı ve Ülseratif Kolit, genetik olarak yatkın kişilerde barsak bakteriyel antijenlerine karşı bozulmuş immun cevaptan kaynaklandığı düşünülen multifaktöryel ve heterojen kronik tekrarlayıcı inflamatuvar barsak hastalıklarıdır (36).Üç büyük CH genom-çaplı ilişki çalışmaları (GWAS) hakkındaki yeni bir meta-analize göre, CH ile köklü/yerleşik ilişkiler, CH'da görülen genetik varyasyonun sadece yüzde 20'sini teşkil etmekte, bu da daha başka genetik katkıların hala keşfedilebileceğine işaret etmektedir (17). NOD2 hariç diğer yatkınlık genlerinin etkilerinin az olduğu yayınlanmıştır (17). İkinci bir aday gen yaklaşımı kullanırsak, son zamanlarda NLRP3, daha önce yayınlanmış, GWAS'da tarif edilmemiş yeni bir CH duyarlılık lokusu olarak tanımlandı (195-200). NLRP3 (daha önce CIAS1 olarak da bilinen) CATERPILLER (CARD, Transcription Enhancer, R (purine)-binding, Pyrin, Lots of Leucine Repeats) (147) gen ailesine aittir ve bu genlerin mutasyonlarının şiddetli otoinflamatuvar hastalıklara (AIDs) neden olduğu gösterilmiştir. Otoinflamatuvar hastalıklar, otoimmun hastalıkların aksine, yüksek titre otoantikorların veya antijen spesifik T hücrelerinin yokluğu olan, görünüşte provake edilmeden tekrarlayan epizodlar halinde inflamasyonla karakterize hastalıklardır (10). NLRP'deki fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar üç hereditör periodik ateş sendrom ile ilişkilidir: Muckle-Wells sendrom, ailesel soğuk ürtikeri ve neonatal başlangıçlı inflamatuvar hastalık (NOMİD) (147,157,201,202). NLRP3, NALP3 'ü (cryopyrin olarak da bilinir) kodlar. Bu protein, inflamasyonun iki anahtar mediatörü IL-1b prosesini ve caspaz 1 aktivasyonunu regüle eden kritik moleküler bir platform olan inflamazomu kontrolde anahtar rol oynar (157, 202, 203, 204).

Son zamanlarda, MEFV geni tarafından kodlanan pyrin proteinin SPRY (B30.2 olarak da bilinen) bölgesinin, NALP3/cryopyrin, caspase-1 ve onun substratı, pro-IL-1b'yı içeren inflamazom komplekleri ile etkileşimi olduğu ve aktivitelerini düzenlediği rapor edilmiştir (23,160,205). İlginç olarak, MEFV'nin yanlış anlamalı mutasyonları bir diğer otoinflamatuvar hastalık olan FMF'i işaret eder (22,100,125,206).

Ek klinik ve epidemiyolojik kanıtlar potansiyel İBH aday gen olarak MEFV'yi desteklemektedir. İBH ve FMF ortak klinik ve biyolojik özelliklere sahiptirler; her ikisi de yangı alanında nötrofil infiltrasyonu ve anormal apoptosis regülasyonu olan, kronik tekrarlayıcı davranış biçimi ile karakterize inflamatuvar hastalıklardır (141,207). Ayrıca FMF esas olarak Akdeniz'i çevreleyen etnik grupları (örneğin, Non-Askenaz Yahudiler, Ermeniler, Türkler, Araplar) etkiler ve bu bölgeden şiddetli FMF'i olan Non-Askenazi Yahudilerde yapılan iki çalışmada İBH'nın artmış prevalansının bildirilmesi, bu iki hastalığın inflamasyonlarının altta yatan mekanizmasının muhtemelen aynı olduğunu düşündürüyor (24,28).

FMF ve İBH arasındaki ilişkiyi araştıran ilk dikkat çekici çalışmalardan biri Cattan ve ark'nın FMF'li 173 Non-Askenaz Yahudi ailesini, İBH için incelediği çalışmadır. 173 ailenin (toplam 300 kişi) 9'unda FMF ve İBH ilişkisi gözlemlenmiştir. Ailelerinde ya da kendilerinde İBH olduğu saptanan bu 9 FMF hastası ve aileleri, MEFV geni için sıcak bölgeler olan exon 2 ve 10'da görülen mutasyonlar için taranmıştır. 9'u Akraba olmak üzere 14 kişide FMF, 8 kişide İBH, 3 kişide ise FMF-İBH birlikteliği görülmüştür. Non-Askenaz Yahudi FMF hastalarında İBH görülme sıklığının, Non-Askenazlarda beklenen İBH prevalansından yaklaşık 10 kat fazla olduğu bulunmuştur. Dahası Cattan ve ark'ın yaptıkları klinik gözleme göre, FMF'i olan İBH hastalarında, FMF'i olmayanlara göre İBH kliniği daha şiddetli seyretmektedir. Bir inflamatuvar hastalıktan sorumlu genlerin diğer inflamatuvar hastalıklar üzerine düzenleyici etkilerinin olabileceği, FMF ve İBH'nın inflamatuvar süreçlerinin birbirini etkileyebileceği fikri bu çalışmayla ortaya konulmuştur (28).

Fidder ve arkadaşları 2002 yılında (24), Cattan ve arkadaşlarının 2000 yılında Fransız Non-Askenaz Yahudilerde, en az 1 kişinin FMF olduğu ailelerde yaptığı çalışmanın genişletilmiş bir benzerini İsrail'de yapmışlardır. Bu çalışmada yaklaşık 5 bin FMF hastası taranmış, Crohn Hastalığı birlikteliği olan 7 hasta bulunmuş. FMF hastalarında CH için görülen bu prevalansın genel popülasyonun prevalansından (50.6/100000) fazla olduğu gösterilmiştir. FMF-CH birlikteliği olan bu 7 hastanın klinik karakterleri, sadece FMF olan yaş grupları benzer 20 olgu ve sadece CH olan 46 olgudan oluşan iki ayrı kontrol grubunun klinik özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Fidder bu çalışmasında, FMF-CH birlikteliği olan hastalarda CH'nın klinik gidişinin, CH kontrol grubundan farklı olmadığı ve bu birliktelikten FMF'in klinik olarak hasta

aleyhine etkilendiği sonucuna varmıştır. FMF-CH birlikteliği olan hastalarda, FMF de atak sıklığının ve amiloidoz riskinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde artmış olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada işaret edilen diğer iki noktadan biri FMF-CH birlikteliği olan 7 hastanın Crohn teşhis edilme yaşının (ortalama 46), kontrol Crohn grubundan yüksek olmasıdır (ortalama 26). Bu fark FMF ve Crohn Hastalığının ortak semptomları dolayısı ile teşhis edilmedeki gecikmeye bağlı olamayacak kadar yüksek görünmektedir. Çalışmanın işaret ettiği diğer nokta ise bu 7 hastanın 4'ünde üçüncü bir inflamatuvar hastalığının olmasıdır. Crohn, FMF'de sık görülen tek inflamatuvar hastalık değildir. Behçet Hastalığı, Poliarteritis Nodosa, Henoch Schönlein Purpura'nın da FMF'den müzdarip hastalarda sık görüldüğü bildirilmiştir (208-210). Bu ilişkiler altında yatan faktörler belirlenememiştir. Bizim çalışmamızın sekonder amacı da bu ilişkilere ışık tutmaktır. Bu bakış açısı ile Fidler'in hastalarında 3.bir inflamatuvar hastalık olması ilginçtir. Fidler'in çalışmasının bu bulguları MEFV geninin diğer iltihaplı hastalıkların ekspresyonunu etkileyen bir modifiye edici olarak hareket etme olasılığının olduğunu düşündürmektedir, ya da diğer inflamasyonla ilgili genler FMF'i tetikliyor olabilir. Örneğin, İBH'ı da içeren birçok inflamatuvar hastalıkla ilişkili MICA'nın (major histocompatibility complex class I chainrelated A gene) FMF'de düzenleyici bir lokus olabileceği rapor edilmiştir (211-213). Bu konudaki üçüncü bir olasılık ise FMF'le uyarılan inflamasyon klinik olarak sessiz genetik predispoze hastaları provoke ediyor olabilir.

Bizim çalışmamızın bir benzerini 2005 yılında Fidler ve arkadaşları yine İsrail'de, Non-Askenaz ve Askenaz Yahudiler'de, 105 Crohn hastasında sık görülen M694V, V726A ve E148Q mutasyonlarını araştırarak yapmıştır. Çalışmaya klinik olarak FMF teşhis edilen 5 hasta da dahil edilmiştir. Crohn Hastalığı olan Non-Askenaz Yahudilerde, FMF kliniği ile ilişkilendirilmiş, mutasyonların sıklığını ve saptanacak mutasyonların klinik üzerine etkisini görmeyi amaçlamışlardır. Hastalarda, hastalığın başlangıç yaşı, hastalık lokalizasyonu davranış biçimi, eşlik eden extraintestinal bulguları ve uygulanan tedavi rejimleri kaydedilip mutasyon çıkanlar ve çıkmayanlar arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Fidler ve arkadaşlarının bu çalışmasında FMF olmayan Crohn hastalarında taşıyıcılık sıklığı %13 bulunmuştur. Bu da İsrail Yahudilerinin CH için genel prevalansından farklı değildir ve MEFV'yi bir yatkınlık geni olarak düşündürmemektedir. Ancak klinik özellikler

incelendiğinde ise mutasyon taşıyanlarla taşımayan Crohn hastaları arasında hastalık davranış biçiminde ve extraintestinal bulguların varlık sıklığında anlamlı fark bulunmuştur. MEFV geninde bakılan mutasyonları taşımanın hastalıkta fibrotik davranış biçimini yaklaşık 4 kat arttırdığını ve extraintestinal bulguların anlamlı olarak daha sık olduğunu rapor etmişlerdir. Taşıyıcı ve taşıyıcı olmayanlar arasında hastalık şiddeti farklılığını ortaya koymak için immün supresif tedavi ihtiyacı ve cerrahi gereksinimi araştırılmış ancak anlamlı bir fark olmadığı rapor edilmiştir (29).

Karban ve arkadaşları etnik kökeni karışık olan 209 İsrailli Crohn hastasında, sık görülen MEFV mutasyonlarının CH yatkınlığı ve heterojenitesi üzerine dağılım ve katkısını incelemiştir. Tüm hastalarda MEFV ve NOD2/CARD15 genotiplerini analiz ederek genotip fenotip korelasyonunu değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda MEFV mutasyonlarının CH'da major modifiye edici faktör olmadığı vurgulanmıştır. Ancak E148Q varyantının perianal hastalığa yatkınlıkla ilişkili olduğunu işaret etmişlerdir (214).

Sicilya'da 84 CH ve 72 sağlıklı kontrolle yapılan bir çalışmada MEFV geninde taşıyıcılık hasta grubunda %4 bulunmuştur. Kontrol grubunda hiç mutasyon gözlenmediği rapor edilmiştir. Bu coğrafik bölge için MEFV geni varyantlarının CH'da yaygın ya da modifiye edici faktör olmadığının altı çizilmiştir (215).

İnflamatuvar barsak hastalıklarından Ülseratif Kolit'in MEFV geni ile olan korelasyonunu belirlemeye çalışan ilk çalışma Yunanistan'da Giaglis ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Giaglis ve arkadaşları henüz tedavi almamış 25 ÜK hastasını, 25 RA ve 65 sağlıklı bireyi kontrol olarak çalışmaya dahil etmişlerdir. Exon 2 ve 10'da mutasyon tarama metodu olarak Nonisotopic RNase Cleavage Assay (NIRCA) kullanılmış, sonuçların teyidi DNA dizileme metodu ile yapılmıştır. ÜK hastalarının yaşları, cinsiyetleri ve hastalık lokalizasyonları belirlenmiştir. Yapılan taramada 25 ÜK hastasının 7'sinde FMF kliniği ile ilişkilendirilmiş mutasyon görülürken, RA kontrol olgularından 1 ve sağlıklı kontrol bireylerinden 1 olmak üzere kontrol gruplarında toplam iki kişide benzer mutasyonlar görülmüştür. ÜK hastalarındaki bu taşıyıcılık oranı anlamlı olarak her iki kontrol grubundan da farklıdır. Mutasyon bulunan 7 ÜK hastasının 4'ünde extraintestinal bulgu olarak artrit olduğu rapor edilirken mutasyonu olmayan, geriye kalan 18 ÜK hastasında benzer klinik tabloya

rastlanmadığı Giaglis ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. ÜK hastalarının genetik olarak ayrılmış bir grup olduğunu düşündüren bir bulgu çalışmada dikkati çekmektedir. ÜK’de, MEFV geninde daha önce FMF ile ilişkilendirilen, (20) gen içi 4 SNPs’den (D102D, G138G, A165A, R202Q) oluşan haplotipin varlığının ve sağlıklı kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklılığının altı çizilmektedir. Çalışmaya bu bulgu üzerine sonradan dahil edilen 15 FMF kontrol hastasında bu haplotip araştırılmış ve ÜK hastalarında kontrol grubundan anlamlı ölçüde fazla bulunmuştur (31).

FMF’in sık görüldüğü bir doğu Akdeniz ülkesi olan Türkiye’de İBH’nın aday yatkınlık geni (MEFV) ile ilgili çalışmalar 2009 yılında gelmeye başlamıştır.

Yurtçu ve arkadaşları 47 İnflamatuar Barsak Hastası (35 ÜK, 12 CH) üzerinde sık görülen mutasyonların saptanabildiği reverse hibridizasyon strip assay yöntemi ile varyantların İBH’nın klinik durumuna etkisini saptamayı amaçlamıştır. Çalışmada 25 sağlıklı kontrol bireyde de benzer şekilde MEFV genotipi belirlenmiş, İBH hastaları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Çalışmaya alınan hasta grubu, hastalık lokalizasyonu extraintestinal bulgular bakımından betimlenmiş, taşıyıcı olan grupla olmayan grup arasında klinik özellikler bakımından extra intestinal bulgu varlığı dışında anlamlı bir fark bulunamamıştır. MEFV mutasyonu taşımayan grupta extra intestinal bulguların taşıyanlara göre anlamlı derecede hastalığa daha fazla eşlik ettiği rapor edilmiştir (33).

Uslu ve arkadaşları ülkemizde yaptıkları bir çalışmada İBH’dan muzdarip yaş ortalaması 13 olan, 16 ÜK, 14 CH, 3 intermediate kolitli 33 çocukta FMF birlikteliğinin İBH üzerine klinik etkisini, aynı grupta sadece İBH’sı olan olgularla karşılaştırarak tespit etmeyi amaçlamıştır. FMF–İBH birlikteliği olan (n=7) ve sadece İBH olan (n=26) hastalar, sık görülen 12 MEFV mutasyonu için taranmıştır. Demografik veriler, klinik ve laboratuvar bulguları hastalık şiddetinin parametreleri olarak alınmıştır. Zaten FMF olan 7 olgu dışında 4 İBH hastasında da MEFV mutasyonu saptanmıştır. Bu olgularda en sık mutasyonun M694V olduğu ve iki grup (taşıyıcı olan ve olmayanlar) arasında hastalık şiddeti açısından aralarında bir fark bulunmadığı rapor edilmiştir (7).

İnfantil inflammatuar Barsak Hastalığı ile MEFV ilişkisinin altını çizen çalışma Sarı ve arkadaşlarının olgu sunumudur. Hayatlarının ilk altı ayında İBH başlamış olan 3 ÜK hastasının hepsinde MEFV gen mutasyonlarının pozitif (2'si M694V+/-, 1'i M694V+/+) bulunduğunu rapor etmiştir. Homozigot mutasyon görülen bebeğin mutasyon saptanmadan önce kolektomi olduğunu bildirmiştir. Sarı ve arkadaşları bebeklik çağı İBH'nın 1 yaş öncesi başladığından hastalığın başlamasında genetik faktörlerin çevresel faktörlerden daha önemli olabileceğini bildirmiştir (32).

Türkiye'de erişkinlerde, inflammatuar barsak hastalıklarından ÜK için bir çalışmayı da Yıldırım ve arkadaşları yapmıştır. Toplam 54 ÜK ve 20 RA hastasının dahil edildiği çalışmada tüm hastalarda sık görülen MEFV mutasyonları taranmıştır. ÜK hasta grubu distal hastalığı olanlar, pankolonik hastalar, kolektomili hastalar olarak üç gruba ayrılmıştır. Ortalama 5 yıl takip edilen olguların steroidle tedavi, immüsupresifle tedavi edilen atak sayıları hastalık şiddetini değerlendirmek için kullanılmıştır. Tüm ülseratif kolitli hastalarda MEFV mutasyonu taşıyan olgularda taşımayanlara göre steroidle tedavi edilen atak sayılarının daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca kolektomi olan hasta grubunun mutasyon sıklığı, RA'li gruptan anlamlı olarak fazla iken, tüm ÜK'liler içinde mutasyon sıklığının RA grubundan farklı olmadığı gösterilmiştir. Kolektomili grup ile diğer ülseratif kolit hastaları (pankotonik, distal kolit) arasındaki mutasyon sıklığının farklı olmadığı görülmektedir. Ilımlı FMF kliniği ile anılan E148Q mutasyonunun görülen en fazla mutasyon ve kolektomili hastalarda varlığının %41.6 olduğuna dikkat çekilmiştir (216).

FMF ile İBH birlikteliğine çocuklarda ışık tutmayı amaçlayan, Türkiye'den Beşer ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada klinik olarak FMF teşhis edilmiş 78 olgu İBH'nın sık görülen semptom ve bulguları (kronik diare, kanlı mukuslu dışkılama, anormal abdominal ağrı, ASCA ve p ANCA pozitifliği) açısından araştırılmıştır. İBH klinik şüphesi olan 20 FMF hastasına endoskopik ve radyolojik incelemeler sonucunda 12'sinde İBH (11 ÜK, 1 CH) teşhis edilmiştir. FMF-İBH birlikteliği olan bu hastalara MEFV gen analizi yapıldığında en fazla bulunan mutasyon %41.7 (12 hastanın 5'inde) M694V olmuştur. K695R ise %25 hastada saptanmıştır. Beşer ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmanın ilk sonucu 12/78 oranı ile FMF'de İBH görülme sıklığının normal popülasyondaki İBH sıklığından ya da

Avrupadaki sıklıktan fazla olduğudur. Diğer bir sonuç ise FMF hastalarında nadir görülen bir mutasyon olan K695R'nin İBH varlığında sıklığının artmış olabileceğidir. Ya da diğer bir söylemle K695R varlığında FMF de İBH sıklığı artmaktadır (217).

NOD2/CARD15 gen mutasyonlarının İBH ile ilişkisi iyi bilindiğinden ek bir bölgesel ve spesifik risk faktörü olarak FMF ilişkili MEFV varyantlarının İBH ile ilişkisi Akyüz ve arkadaşlarınca da incelenmiştir. 137 İBH (62 CH, 75 ÜK) ve hastalarla aynı şehirlerde doğmuş 101 sağlıklı kontrol birey çalışmaya kabul edilmiştir. Gruplarda MEFV'nin sık varyantları (E148Q, M608I, M694V ve V726A) ve NOD2 varyantları taranmıştır. MEFV'de mutasyon frekansı İBH hastalarında (%28 ÜK, %22,6 CH) sağlıklı kontrol bireylerden (%9.9) anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. MEFV Exon 10'daki mutasyonların (M680I, M694V ve V726A) bu ilişkiyi kuvvetlendiren ana bölge olduğunu düşündüren bu çalışmada M694V (%14.5 CH, %17 ÜK ve %3 kontrol) varyantının hastalığa yatkınlıkla ilişkisinin yanı sıra, bu mutasyonu taşıyan Crohn hastalarında fistülizan davranış modeliyle de ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Dahası tüm hastalarda (CH, ÜK) M694V taşıyanlarda, taşımayanlara göre extra intestinal bulgu varlığının arttığı söylenmiştir. Ancak bu farklılığın, CH ve ÜK hastaları için ayrı ayrı değerlendirildiğinde ÜK hastaları için geçerli, CH grubu için geçerli olmadığı vurgulanmıştır. Akyüz ve ark. bu çalışmada, hastaların hastalık şiddetini ya da hastalık lokalizasyonu ya da hastalık paternleri açısından mutasyonların varlığının etkilerini değerlendiren bir veri sunmamışlardır. Akyüz'ün bu çalışması MEFV varyasyonlarının dünyada taşıyıcılığı yüksek olan bölgelerde ek bir İBH'na yatkınlık faktörü olabileceğini ve İBH'da bölgesel farklılık gözlenebileceğini düşündürmektedir (218).

İBH ve FMF'in benzer biyolojik ve klinik özellikleri vardır. Sebebi tam olarak bilinemeyen tekrarlayan ataklar halinde bölgesel inflamasyonun meydana getirdiği semptomlarla prezente olmanın yanı sıra sistemik özellikler gösteren bulgular göstermesi bunlardan bazılarıdır. İki hastalık da inflamasyon alanında nötrofil infiltrasyonu olan ve anormal apoptoz regülasyonunun söz konusu olduğu otoinflamatuvar hastalıklardır. Moleküler düzeyde düşünüldüğünde bugüne kadar elde edilen veriler, İBH'na yatkınlıkta kritik gen olan NOD2/CARD15 ve FMF kliniğinden sorumlu MEFV geninin aynı kromozom üzerinde yer aldığı ve

inflamasyonda benzer işlevler gösteren ortak yapılar içeren proteinleri sentezlediklerini göstermektedir. MEFV gen ürünü pyrin, inflamasyonun anahtar mediatörü IL-1 b' nin sentezinin gerçekleştiği inflamazom kompleksleri ile ilişkilidir.

Son yıllarda meydana gelen gelişmeler klinik prezentasyonları birbirinden yer yer farklı görünen otoinflamatuvar hastalıkları, moleküler patofizyolojilerine dayanarak bir arada sınıflayarak sistemik otoinflamatuvar hastalıklar fikrini ortaya atmaktadır (1). FMF bu hastalıkların prototipidir (1). FMF'den sorumlu MEFV geninin, doğal bağışıklıkta inflamasyonun regülasyonundaki rolü nedeniyle başka otoinflamatuvar hastalıkları da modifiye edici ya da bu hastalıklarla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (28).

İBH'na yatkınlıkta ve klinik şiddetini yönetmede aday gen olabileceğini düşündüğümüz MEFV geninin İBH'da gösterdiği varyasyonların tipini ve sıklığını, bulmaya çalıştık.

MEFV geninde, bir kısmı polimorfizm olarak tanımlanan 300'e yakın mutasyon gösterilmiştir. Çoğunluğu yanlış anlamlıdır ve exon 2 ve 10 üzerindedir. FMF için sıcak bir bölge olan exon 2 ve 10'da, sadece 37'si proteinin primer yapısını değiştirmeyen sinonim polimorfizm olan yaklaşık 180 mutasyon görülmektedir.

FMF'de MEFV genindeki mutasyonlarını araştıran rutin incelemelerin çoğu sık görülen mutasyonları incelemeye yönelik testlerdir. Örneğin revers hibridizasyon esaslı strip test, FMF kliniği ile ilişkili sık görülen 10-12 mutasyonu incelemeye olanak verir. Biz çalışmamızda mutasyonları saptamak için mutasyonların yaklaşık üçte ikisini görebileceğimiz exon 2 ve 10 bölgelerini DNA dizi analizi yöntemini kullanarak taradık. Böylece diğer yöntemlerin aksine hasta gruplarında ve kontrol grubunda, exon 2 ve 10'da nadir ve sık görülebilecek polimorfizmler dahil yaklaşık 180 varyantı saptama şansımız vardı. DNA dizi analizini kullanarak İBH ile MEFV geni ilişkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma vardır (219).

Bizim çalışmamız Türkiye'de İBH hastalarında exon 2 ve 10'daki tüm mutasyonları tarayan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda 45 Crohn, 55 Ülseratif Kolit toplam 100 hastayı ve kontrol grubu olarak 20 sağlıklı bireyi taradık. FMF çalışma grubunun verilerine göre de

Türkiye’de taşıyıcılık oranı %20 olup hasta grubumuzla benzerdir (93). Tüm İBH hastalarının %20 sinde, kontrol grubunun ise %15 inde mutasyon gözlemlendi. Bu iki oran anlamlı ölçüde birbirinden farklı değildi. Ülseratif kolitte mutasyon sıklığı %14,5 idi ve kontrol grubu ile anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Crohn hastalarında ise %26,7 olan mutasyon sıklığının kontrol grubu ile arasında anlamlı fark bulamasak da Türkiye’de belirtilen mutasyon sıklığından fazladır. Biz Crohn ve Ülseratif Kolit hastalarında MEFV geninin mutasyon sıklığını kontrol grubundan farklı bulamadığımızdan, İBH’na yatkınlık geni olduğunu düşünmedik. FMF’in sık olduğu Türkiye’nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde FMF-İBH ilişkisini açıklamayı amaçlayan bir kısım çalışmada FMF kliniği olan hastalarda İBH’nın sık görüldüğü bulunmuştur (24,28,217). Yapılan diğer çalışmalarda bizim çalışmamızın sonucuna benzer olarak MEFV mutasyonlarının İBH’da sık görülmediği, İBH için yatkınlık geni olmadığı sonucu çıkmıştır (29,33,214,215,216,219). MEFV’nin Yatkınlık geni olmadığı sonucu çıkan çalışmaların, bizim çalışmamızla ortak noktaları klinik olarak FMF teşhis edilmemiş İBH hastalarında MEFV genini araştıran çalışmalar olmasıdır. Bu nedenle MEFV’nin İBH için yatkınlık geni olmadığı fikri kuvvet kazanmaktadır. Fiddler, Cattani ve Beşer’in çalışmalarında hastalar FMF hastasıdır ve bu hastalarda İBH’nın popülasyona göre daha sık görüldüğü rapor edilmiştir. Bu konuda akla gelen soru şudur; FMF’de İBH daha sıkken neden İBH’da FMF mutasyonu sık değildir? Bu durum MEFV mutasyonlarının tek başına İBH’na yatkınlık oluşturmada olduğu ancak İBH’na yatkınlığı olan kişilerde İBH’nı provoke edebileceği sonucunu düşündürebilir. FMF’le uyarılan inflamasyon, genetik predispoze klinik olarak sessiz hastaları provoke ediyor olabilir. Türkiyede Akyüz ve ark.’nın çalışması sadece İBH’sı olan hastalarda MEFV mutasyonlarını kontrol grubundan anlamlı ölçüde sık bulmuştur. Bu çalışmada kontrol grubunun taşıyıcılık oranı %9.9 dur ve Türkiye’deki genel popülasyon taşıyıcılık verileri ile örtüşmemektedir (93). Akyüz ve ark.’nın çalışmasında CH’larında taşıyıcılık %22.6 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise %26.7 dir. Bu oranlar Türk popülasyonundaki taşıyıcılıktan fazla olduğundan daha fazla sayıda hastayla yapılacak çalışmalarla tekrar değerlendirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

MEFV gen mutasyon sıklığını normal popülasyondan fazla bulmadığımız İBH’nda, mutasyon taşımanın İBH’nın fenotipine ve klinik özelliklerine yansımaları

görmeye çalıştık. Hasta gruplarında mutasyon taşıyanlarla taşımayanları birbirleriyle karşılaştırdık. İlk olarak Fidler'in çalışmasında iddia edilen FMF'li İBH hastalarının hastalık başlangıç yaşının daha ileri olması durumunu inceledik. FMF'le ortak klinik özellikleri olması, İBH'nın FMF'de geç teşhis edilmesini sağlıyor olabilir. Çünkü biz MEFV'de mutasyon taşıyan hastalarımızın hastalık başlangıç yaşını, taşımayanların başlangıç yaşından farklı bulmadık ($p>0.05$). Bu bulgu MEFV'nin İBH semptomlarını ve kliniğini geciktirici etkisinin olmadığını, ancak FMF'in İBH ile ortak bazı semptomlarının hastalara tanı konmasında gecikmeye yol açıyor olabileceğini düşündürdü.

MEFV gen ekspresyonunun, kontrol bireylere göre hayvan çalışmalarında ve insandan alınan ülser kolonik mukozalardan alınan biopsilerde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (219). Literatürde genotip-fenotip korelasyonunu inceleyen hemen tüm çalışmalar, İBH lokalizasyonunda MEFV mutasyonlarının etkisine bakmışlardır, fakat özellikli bir sonuç bulamamışlardır. Biz de bulamadık. Ülseratif kolit hastalarının extensif kolit olması ile sol kolit olmasının ya da Crohn hastalarının ileal tutulumlu ya da kolonik tutulumlu olmasının MEFV gen mutasyonu olması ile ilgili olmadığını gördük. Ancak üst gis tutulumlu crohn hastamız olmadığından, üst gis ve alt gis tutulumlu hastaların mutasyon taşıyıcı olup olmamaya ilgisini değerlendiremedik. E148Q mutasyonunun perianal hastalık eğilimini arttırdığı belirtilmiştir (214). Perianal hastalığı olan 12 Crohn hastamız vardı. Bu hastaların 3'ünde mutasyon görüldü. Ancak perianal hastalığı olmayanlarla aralarında mutasyon sıklığı bakımından anlamlı bir fark yoktu.

Crohn hastalığında hastalığın klinik komplikasyonlarını ve semptomlarını belirleyicilerinden biride hastalık davranış biçimidir. Kimi hastalar inflamasyon bölgesinde fibrotik/striktürel davranış gösterirken, kimi fistülizan olma eğilimindedir, kimi ise sadece inflamatuvar davranış biçimine maruz kalır. İnflamasyon üzerinde regülatuar etkili pyrinin hastalığın bu özellikli durumu üzerine etkisini de araştırdık. MEFV mutasyonunun striktürel davranışla ya da fistülizan davranışla ilgisi olduğu önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (29,218). Biz mutasyon taşımanın davranış modeliyle ilgisini bulamadık.

MEFV geni ile İBH fenotip ilişkisini belirlemeye çalışırken mutasyonların İBH’da görülen extraintestinal bulguların sıklığına etkisini de inceledik. Tüm İBH grubunda 16 hastada (ÜK=9, Crohn=7) extraintestinal bulgu vardı. Mutasyon taşıyan ve taşımayan grupta extraintestinal bulgu sıklığı bakımından fark yoktu. Extraintestinal manifestasyonların MEFV mutasyonu ile sıklığının arttığını rapor eden çalışmalar vardır (29,31). Ancak bir kısım çalışmalarda ise MEFV mutasyon sıklığına etkisinin olmadığını bulmuşlardır (214,216). Hatta Türkiyeden bir araştırmacıda mutasyon taşıyan hastaların, taşımayanlardan anlamlı derecede az extraintestinal bulguya sahip olduğunu iddia etmiştir (33).

Çalışmamızda MEFV mutasyonlarının hastalık şiddetine etkisini araştırdık. Hastalık şiddetini takip süresi boyunca (ortalama 5 yıl) bir yılda gösterdiği atak sayısını, remisyon sağlanabilmesi için immunomodülatör gereksinimi, biyolojik ajan gerekliliği ya da cerrahi ihtiyaç gibi, kliniği ve kliniğin hasta üzerinde oluşturduğu maduriyeti işaret eden parametreleri kaydederek belirledik. Yılda ikiden fazla atak geçiren hastaları sık tekrarlayan hastalık sınıfına kaydettik. Yaptığımız inceleme sonucunda mutasyon taşıyan hastalar taşımayanlara göre daha sık ya da daha az atak geçirmiyordu. FMF kliniği ile ilişkili mutasyon taşıyıcı ve taşıyıcı olmayan gruplar arasında steroid gereksinimi, immun modülatör gerekliliği ve biyolojik ajan gerekliliği bakımından fark yoktu. Ancak cerrahi gereksinim mutasyon taşıyan İBH’lılarda anlamlı ölçüde fazlaydı. İBH hastalarında cerrahi gereksinimi açıklamada E148Q (p=0.036) ve M694V (p=0.036) bir arada anlamlı bulundu. Yaptığımız lojistik regresyon analizinde de E148Q ve M694V birlikteliği modeli, cerrahi gereksinimi (her iki mutasyon ayrı ayrı 6 kat) arttırmaktaydı. MEFV mutasyonlarının İBH’da modifiye edici bir faktör olduğunu söyleyen çalışmalar (28,32,216,220) ve bizim bu bulgumuz ışığında mutasyon varlığının ya da özellikle bazı mutasyonların İBH’da hastalık şiddetini modifiye edici bir faktör olduğu düşünülebilir.

Hasta grupları ayrı ayrı incelendiğinde Crohn hastalarında mutasyon taşıyanlarla taşımayanlar arasında cerrahi gereksinim bakımından fark gözlenmezken, Ülseratif Kolit hastalarında mutasyon taşıyanların daha fazla cerrahi geçirdikleri sonucuna varıldı. Acaba bir mutasyon tipi ile cerrahi gereksinim özellikle ilgili miydi? Bu sorunun cevabı ilginçti, çünkü daha önce E148Q’nun

ülseratif kolit hastalarında en sık görülen MEFV mutasyonu olduğu bildirilmiştir (216). Aynı çalışma kolektomi olan ülseratif kolit hastalarında compound heterozigotlarla birlikte, % 41.6 oranında E148Q varlığının altını çizmiştir. Bizim çalışmamızda da ülseratif kolitte en sık görülen mutasyon tipi E148Q idi ve kolektomi olan hastaların %40'ında E148Q mutasyonu vardı. E148Q mutasyonu ılımlı, en az penetre olan FMF mutasyonu olarak bilinir. Türk popülasyonunda FMF hastalarında görülen en sık mutasyon değildir. M694V 45%, M680I 13%, V726A 11%, M694I 7%, ve E148Q 2% oranında görülür (126). Sağlıklı kontrollerde taşıyıcılık oranı ise daha yüksektir(E148Q 12%, M680I 5%, M694V 3% ve V726A 2%) (121).

Biz dahil araştırmacılar, şimdiye kadar MEFV mutasyonlarının İBH'ya yatkınlık oluşturmada risk olduğu ya da bu hastalıkta sık görüldüğü yönünde ortak bir fikir oluşturamamak da, yoğunlaşılması gereken konunun bu mutasyonların varlığında İBH'nın klinik şiddetinin artıp artmadığı olduğunu düşünüyoruz. Cerrahi ihtiyacı doğmuş hastaların sık atak geçirdiği ve ataklarının şiddetli seyrettiği ya da yaygın tutulumlu hastalar olduğu düşünülecek olursa, inflamasyonun regülasyon ayağında önemli fonksiyonu olan pyrin proteinini kodlayan MEFV genindeki mutasyonlar İBH hastalarında da araştırılmalıdır. FMF hastalarında remisyon sağlayabilen kolşininini de içeren bir tedavi rejimi bu konuda yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla İBH hastalarında da önerilebilir.

6.ÖZET

İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIKLARINDA MEFV GENİ MUTASYONU SIKLIĞI VE KLİNİKLE İLİŞKİSİ

Dr.Sezen KOCAÖZ

Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Kliniği

(Uzmanlık Tezi / Tez Danışmanı: Dr. Derya GÜLEÇ)

İzmir, 2014

Amaç: İBH (Crohn ve Ülseratif Kolit) genetik olarak yatkın kişilerde bağırsak bakteriyel antijenlerine karşı bozulmuş immün cevaptan kaynaklandığı düşünülen multifaktöriyel ve tekrarlayıcı inflamatuvar hastalıklardır. FMF (Famial Mediterranean Fever) periyodik inflamatuvar klinik sendromların prototipidir. Periyodik ateş ve serozaların iltihabı ile karakterizedir. FMF ve İBH ortak klinik ve biyolojik özelliklere sahiptirler. Her ikisi de yangı alanında nötrofil infiltrasyonu ve anormal apoptoz regülasyonunun olduğu, kliniklerinde relaps ve remisyonların görüldüğü kronik, periyodik inflamatuvar hastalılardır.

FMF'den sorumlu MEFV geni 781 aa'lık pyrin adı verilen bir proteini kodlamaktadır. İBH'a yatkınlık geni olduğu düşünülen NOD2/CARD15 ve MEFV geni 16. kromozomda yer almakta, aynı protein ailesine ait, benzer yapılar içeren proteinleri (pyrin ve NOD2/CARD15) sentezlemektedirler.

Pyrinin inflamasyonun kontrolünde kilit bir rolü vardır. İBH ve sistemik otoiflamatuvar hastalıkların prototipi olan FMF birlikteliği ile ilgili yapılan çalışmalar, FMF mutasyonlarının genetik olarak İBH'a yatkınlık oluşturabileceğini ve İBH kliniği üzerine modifiye edici bir faktör olabileceğini düşündürüyor. İBH'dan muzdarip hastaların klinik seyirleri hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Kimi hasta remisyon için cerrahiye ihtiyaç duyarken, kimi hasta medikal tedaviyle remisyona ulaşmaktadır. Biz bu çalışmamızda MEFV mutasyonlarının İBH'da sıklığını ve klinikle ilişkisini incelemeyi amaçladık.

Materyal Metod: 55 Ülseratif kolit, 45 Crohn hastası ve 20 sağlıklı kontrol grubunun MEFV geninin ilgili bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye

edildi. Sanger yöntemiyle amplifikasyon ürünü dizilendi ve ABI PRISM™ 310 Genetic Analizöründe (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analiz edildi.

Bulgular: Ülseratif kolit hastalarının % 14,5, Crohn Hastalarının % 26,6'sında FMF ilişkili mutasyon saptandı. Hastalardaki mutasyon sıklığı kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklı değildi. FMF kliniği ile ilgili herhangi bir mutasyon varlığının tüm İBH hastalarının kliniğine etkisi değerlendirildi. Steroid gerekliliği, immun modülatör gerekliliği, biyolojik ajan gerekliliği mutasyon taşıyan ve taşımayan hastalar arasında farklı görülmezken, cerrahi gereksinim mutasyon taşıyan grupta anlamlı ölçüde fazlaydı. Hastalarda cerrahi gereksinimi açıklamada E148Q (p=0.036) ve M694V (p=0.036) varlığı bir arada anlamlı bulundu. E148Q ve M694V mutasyonlarının varlığı cerrahi gereksinimi 6.25 (%95 güven aralığı: 1.13-34.64) kat arttırmaktaydı. Ülseratif kolit hastaları incelendiğinde ise E148Q mutasyonun varlığı cerrahi gereksinimi arttırmaktaydı (p=0.037). Crohn hastalarında mutasyon taşıyan ve taşımayanlar arasında cerrahi gereksinim bakımından fark bulunmadı.

Sonuç: MEFV mutasyonlarının İBH'na yatkınlık oluşturmada risk olduğu ya da sık görüldüğü hipotezinin doğruluğu yönünde bir bulguya ulaşamadık. Ancak MEFV geninde FMF ile ilişkili mutasyon taşıyan hastaların cerrahi gereksinimin fazla olduğunu saptadık. Yoğunlaşılması gereken konunun bu mutasyonların varlığında İBH'nın klinik şiddetinin artıp artmadığı olduğunu düşünüyoruz. Cerrahi ihtiyacı doğmuş hastaların sık atak geçirdiği ve ataklarının şiddetli seyrettiği ya da yaygın tutulumlu hastalar olduğu düşünülecek olursa, inflamasyonun regülasyon ayağında önemli fonksiyonu olan pyrin proteinini kodlayan MEFV genindeki mutasyonlar İBH hastalarında da araştırılmadır. FMF hastalarında remisyon sağlayabilen kolşinini de içeren bir tedavi rejimi bu konuda yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla İBH hastalarında da önerilebilir.

6. ABSTRACT

Frequency of MEFV Gene Mutation in İnflammatory İntestinal Diseases and its Relationship to the Clinic

Dr.Sezen KOCAÖZ

Bozkaya Education and Research Hospital, Medical Biochemistry Clinic

(Msters Thesis / Adviser: Dr. Derya GÜLEÇ)

İZMİR/2014

Objective: IBD (Crohn and Ulcerative Colitis) are multifactorial and repetitive inflammatory diseases, thought to originate from degenerative immune responses to bacterial antigens in intestines in genetically predisposed individuals. FMF (Familial Mediterranean Fever) is the prototype of periodical inflammatory clinical syndromes. It is characterized by periodical fever and serosa inflammation. FMF and IBD share common clinical and biological characteristics. Both are chronic and inflammatory diseases in which neutrophil infiltration, and abnormal apoptosis regulation occur in the inflamed area, and relapse and remissions are observed in the clinical.

The MEFV gene responsible for FMF encodes with 781 amino acid protein called pyrin. NOD2/CARD15, which is thought to be the predisposition gene for IBD, and the MEVF gene are located on the 16th chromosome, and synthesize proteins from the same protein family with similar structures (pyrin and NOD2/CARD15).

Pyrin has a key role in controlling the inflammation. Studies concerning the concurrence of IBD and FMF, the prototype of systemic auto inflammatory diseases, suggest that FMF mutations might result in genetic predisposition to IBD, and that it may be a modifying factor on IBD clinical. The clinical progress of IBD differs from patient to patient. While some patients need surgery for remission, others achieve remission by medical treatment. In this study, we aimed to analyze the frequency of MEVF mutations in IBD and its relationship to the clinical.

Material Method: Relevant regions of the MEFV gene were amplified through polymerase chain reaction in 55 ulcerative colitis patients, 45 Crohn patients, and 20 healthy individuals in the control group. Results of the amplification were arranged

with Sanger method, and analyzed in ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Results: The relevant mutation was detected in 14,5 % of the ulcerative colitis patients, and 26,6 % of the Crohn patients. Mutation frequency in patients was not significantly different than the control group. The influence of the presence of any mutation related to the FMF clinical on all of the IBD patients was evaluated. While no difference was observed between patients who had mutations and patients who did not have mutations regarding the need for steroids, immune modulators, or biological agents, the need for surgery in patients with mutations was significantly higher. In explaining the need for surgery in patients, the Concurrent presence of E148Q ($p=0.036$) and M694V ($p=0.036$) was found substantive. The presence of E148Q and M694V mutations increased the need for surgical requirement 6.25 times (confidence interval 95 %: 1.13-34.64). When ulcerative colitis patients were analyzed, the presence of the E148Q mutation increased the need for surgery ($p=0.037$). No difference was found concerning the surgical requirement between the Crohn patients who carried the mutations and those who did not.

Conclusion: We did not attain any indication to suggest the accuracy of the hypotheses that MEVF mutations pose a risk in producing predisposition to IBD, or that these mutations are frequently observed. However, we have determined that the surgical need of the patients with mutation related to FMF in the MEVF gene was high. We think that what should be concentrated on is the possible increase of the clinical severity/intensity of IBD in light of these mutations. Given that patients who require surgery have frequent attacks, and that the attacks are severe or that the patients have prevalent involvement, the mutations in the MEVF gene that encodes pyrin, which has an important function in inflammation regulation, should be studied in IBD patients. A treatment regimen, which includes colchicine that ensures remission in FMF patients, can also be recommended to IBD patients through more comprehensive studies on this subject.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sezen Kocaöz

Doğum Tarihi:13 /04/1978

Email:sezensahin2007@gmail.com

Lisans :

Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Tıp fakültesi	Selçuk Üniversitesi	2002

9.KAYNAKLAR

1. Seth L. Masters, Anna Simon, Ivona Aksentijevich, et al. *Horror Autoinflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease*. Annu Rev Immunol. 2009; 27: 621–668.
2. Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, et al. *TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes*. Curr Opin Immunol 2000;12:479–86. [PubMed: 10899034]
3. Pascual V, Allantaz F, Arce E, et al. *Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade*. J Exp Med 2005;201:1479–86. [PubMed: 15851489]
4. Thomas KT, Feder HM Jr, Lawton AR, et al. *Periodic fever syndrome in children*. J, Pediatr 1999;135:15–21. [PubMed: 10393598]
5. Shoham NG, Centola M, Mansfield E, et al. *Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway*. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:13501–6. [PubMed: 14595024]
6. Ferguson PJ, El-Shanti HI. *Autoinflammatory bone disorders*. Curr Opin Rheumatol 2007;19:492–98. [PubMed:17762617]
7. Nuray Uslu , Aysel Yuce, Hulya Demir, et al. *The Association of Inflammatory Bowel Disease and Mediterranean Fever Gene (MEFV) Mutations in Turkish Children*. Dig Dis Sci. 2010; 55:3488–3494
8. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. *Association of NOD-2 leucine rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature. 2001;411:599–603.
9. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature. 2001;411:603–606.

10. Hugot JP, Laurentpuig P, Gower-Rousseau C, et al. *Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16*. Nature. 1996;379:821–823.
11. Cavanaugh J. *International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn's disease and chromosome 16*. Am J Hum Genet. 2001;68:1165–1171.
12. Curran ME, Lau KF, Hampe J, et al. *Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16*. Gastroenterology. 1998;115:1066–1071.
13. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. *Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations*. Lancet. 2001;357:1925–1928.
14. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, et al. *Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study*. Lancet. 2002;359:1661–1665.
15. Ince AT, Hatirnaz O, Ovu" nc, O, et al. *1007fs, G908R, R702W mutations and P268S, IVS8+158 polymorphisms of the CARD15 gene in Turkish inflammatory bowel disease patients and their relationship with disease-related surgery*. Dig Dis Sci. 2008;53:1683–1692.
16. Uyar FA, Over-Hamzaog" lu H, Tu" re F, et al. *Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease: cases from Turkey*. Dig Dis Sci. 2006;51:706–710.
17. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, et al. *Genomewide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease*. Nat Genet. 2008; 40: 955–962.
18. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. *Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever*. Arthritis Rheum. 1997;40:1879–1885.

19. Ozen S, Hoffman HM, Frenkerl J, et al. *Familial Mediterranean fever (FMF) and beyond: a new horizon. Fourth international congress on the systemic autoinflammatory disease held in Bethesda, USA, 6–10 November 2005.* Ann Rheum Dis. 2006;65: 961–964.
20. Ayaz NA, Ozen S, Bilginer Y, et al. *MEFV mutations in systemic onset juvenile idiopathic arthritis.* Rheumatology. 2009;48:23–25.
21. Ben-Chetrit E, Backenroth R. *Amyloidosis induced, end stage renal disease in patients with familial Mediterranean fever is highly associated with point mutations in the MEFV gene.* Ann Rheum Dis. 2001;60:146–149.
22. The International FMF Consortium. *Ancient missense mutations in a new member of RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever.* Cell. 1997;90:797–807.
23. Chae JJ, Wood G, Masters SL, et al. *The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 modulate IL-1 beta production.* Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:9982–9987.
24. Fidler HH, Chowers Y, Lidar M, et al. *Crohn disease in patients with familial Mediterranean fever.* Medicine 2002; 81:411–416
25. Fiocchi C. *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis.* Gastroenterology .1998; 115:182–205
26. Ozen S, Bakaloglu A, Yilmaz E, et al. *Mutations in the gene for familial Mediterranean fever: do they predispose to inflammation?* J Rheum. 2003;30:2014–2018.
27. Kalyoncu M, Acar BC, Cakar N, et al. *Are carriers for MEFV mutations ‘healthy’?* Clin Exp Rheumatol. 2006;24:120–122.

28. Cattan D, Notarnicola C, Molinari N, et al. *Inflammatory bowel disease in non-Ashkenazi Jews with familial Mediterranean fever*. Lancet. 2000;355:378–379.
29. Fidler HH, Chowers Y, Ackerman Z, et al. *The familial Mediterranean fever (MEFV) gene as a modifier of Crohn's disease*. Am J Gastroenterol. 2005;100:338–343.
30. Fidler HH, Chowers Y, Lidar M, et al. *Crohn's disease in patients with familial Mediterranean fever*. Medicine. 2002;81:411–416.
31. Giaglis S, Mimidis K, Papadopoulos V, et al. *Increased frequency of mutations in the gene responsible for familial Mediterranean fever (MEFV) in a cohort of patients with ulcerative colitis: evidence for a potential disease-modifying effect?* Dig Dis Sci. 2010; 55:3488–3494 3493
32. Sari S, Egritas O, Dalgic B. *The familial Mediterranean fever (MEFV) gene may be a modifier factor of inflammatory bowel disease in infancy*. Eur J Pediatr. 2006;167:391–393.
33. Yurtcu E, Gokcan H, Yilmaz U, et al. *Detection of MEFV gene mutations in patients with inflammatory bowel disease*. Genet Test Mol Biomarkers. 2009;13:87–90.
34. Dubinsky M. *Special issues in pediatric inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol. 2008;14:413-420.
35. Knigge KL. *Inflammatory bowel disease*. Clin Cornerstone 2002;4:49-57.
36. Podolsky DK. *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med. 2002;347(6):417-29.
37. Kildebo S, Nordgaard K, Aronsen O, et al. *The incidence of ulcerative colitis in Northern Norway from 1983 to 1986*. The Northern Norwegian Gastroenterology Society. Scand J Gastroenterol. 1990; 25:890-6.
38. Kildebo S, Breckan R, Nordgaard K, Burhol PG, Jorde R. *The incidence of Crohn's disease in northern Norway from 1983 to 1986*. The Northern

Norway Gastroenterology Society. Scand J Gastroenterol. 1989; 24:1265-70.

39. Dağlı Ü ve İBH Çalışma Grubu. *Epidemiology and genetics of inflammatory bowel disease in Turkey*. Falk Symposium 159. IBD 2007- Achievements in research and clinical practice. Edited by Tözün N, Dağlı Ü, Mantzaris G, Schölmerich J 2007;3-12.
40. Irvine EJ, Farrokhyar F, Swarbrick Et al. *critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol. 2001; 36(1):2-15.
41. TUZCU, Muzaffer(Ed.), *Cecil Essentials of Medicine*, Nobel Tıp Kitabevi, 4.ncü baskı, 2000, s299-303.
42. LOFTUS E,V Jr . *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence and environmental influences*. Gastroenterology. 2004; 126, s1504-1517.
43. VERMEIRE, S; RUTGEERTS, P. *Current status of genetics research in IBD*. Genes and Immunity. 2005; 6: 637-645.
44. Odes HS, Fraser D, Krawiec J. *Incidence of idiopathic ulcerative colitis in Jewish population subgroups in the Beer Sheva region of Israel*. Am J Gastroenterol. 1987; 82(9):854-858.
45. Andus,T,Gross,V. *Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors*.Hepatogastroenterology. 2000;47:29-43.
46. Yang,h.,Mcelree,C.,Roth,M. *Familial entrical risks for inflammatory bowel disease:distances between Jews and non-Jews*.Gut. 1993;34:517-524.
47. Rubin GP, Hungin APS, Kelly PJ, et al. *Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in English general practice population*. Aliment Pharmacol Ther 2000;14:1553-9.

48. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. *Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States*. Gastroenterology 1991; 100:143-9.
49. Boggild H, Tuchsén F, Orhede E. *Occupation, employment status and chronic inflammatory bowel disease in Denmark*. Int J Epidemiol. 1996;25:630-7.
50. Feagan B, Rishmond SY. *Epidemiology of inflammatory bowel disease*. In: Lichenstein GR, ed. *The clinician's guide to inflammatory bowel disease*. USA; Slack:2003 p.1-6.
51. Duerr H. R. *The genetics of inflammatory bowel disease*. Gastroenterology Clinics of North America 2002;31:63-76.ician's guide to inflammatory bowel disease. USA; Slack:2003 p.1-6.
52. Satsangi J, Grootsholten C, Hold H, et al. *Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease*. Gut 1996;38(5):738-41
53. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. *CARD 15/NOD 2 gene mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease*. Am J Hum Genet 2002;70:845-57.
54. Rubin DT, Hanauer SB. *Smoking and inflammatory bowel disease*. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2000;12(8):855-62.
55. Ekbom A, Montgomery SM. *Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2004;18(3):497-508.
56. Loftus EV Jr. *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences*. Gastroenterology 2004;126(6):1504-17.
57. Loftus EV Jr. *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences*. Gastroenterology 2004;126(6):1504-17.

58. Ayşegül DOĞAN DEMİR ,Çocukluk Çağı Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Klinik ve Epidemiyolojik Özelliklerin Belirlenmesi ve Bu Özelliklerin Belirlenmesi ve Özelliklerle Sık Görülen Mutasyonlar Arasındaki İlişkilerin Araştırılması, İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Kliniği,İstanbul,2007.
59. Diagnass AU, Baumgard DC, Sturm A. Review article: *the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease immunology and repair mechanisms*. Aliment Pharmacol Ther 2004;20 Suppl 4:9-17
60. Elphick DA, Mahida YR. *Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease*. Gut 2005;54(12):1802-9.
61. Baumgard DC, Carding SR. *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. Lancet 2007;369(9573):1627-40.
62. Shih DQ, Targan SR. *Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol 2008;14(3):390-400.
63. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. *Nod2 dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science 2005;307(5710):731-4.
64. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM. *The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology 2002;122:867-874.
65. Mosman TR, Cofmann RL. *Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Ann Rev Immunol 1989;7:145-73.
66. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. *Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease: Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of INF-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5*. J Immunol 1996;157:1261-70.

67. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, et al. *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize a typical Th2 response in ulcerative colitis.* J Clin Invest 2004;113:1490-1497
68. Mehmet Yücesoy. *İnflamatuvar barsak hastalıklarında etyoloji ve patogenezi.* Türkiye Klinikleri J İnt Med Sci 2005, 1(34):4-9.
69. Reinisch W, Gasche C, Tiilinger W, et al. *Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse.* Am J Gastroenterol 1999; 94(8):2156-64.
70. Ishiguro Y. *Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis.* J Gastroenterol 1999;34:66-74.
71. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, et al. *Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6.* Gut. 1995;36:45-49.
72. Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice.* Nature 1994;368(6469):339-42.
73. Atreya R, Naurath MF. *Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer.* Clin Rev Allergy Immunol 2005;28(3):187-96
74. Erhan Tatar, *İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Antipankreatik Antikor, Antinötrofilik Sitoplazmik Antikor ve Anti Saccharomyces Cerevisiae Antikoru'nun Rolü,* Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dahiliye kliniği, İzmir, 2014
75. Miner PB. *Clinical features , course, laboratory findings, and complications in ulcerative colitis.* In: Kirsner JB, eds. *Inflammatory Bowel Disease*; 5th ed. Philadelphia, W.B, Saunders Comp. 2000.p.299.
76. Truelove SC, Witts LJ. *Cortisone in ulcerative colitis: final report on a therapeutic trial.* Br Med J 1955;ii:1041-8.

77. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. *The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies consensus and implications*. Gut 2006;55:749–53.
78. Orhan Sezgin. *İnflamatuvar barsak hastalıklarının klinik özellikleri*. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2005; 1(34):1-15.
79. Roux C, Abitbol V, Chaussade S, et al. *Bone loss in patients with inflammatory bowel disease: A prospective study*. Osteoporosis Int 1995;5:156.
80. Abu-Qurshin R, Naschitz JE, Zuckerman E, et al. *Crohn's disease with Pellegrini and increased excretion of 5-hydroxyindolacetic acid*. Am J Med Sci 1997;313:11.
81. Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. *Long-term follow-up of patients of Crohn's disease: Relationship between clinical pattern and prognosis*. Gastroenterology 1985;88:1818.
82. Wagtmans MJ, van Hogezaand RA, Griffioen G, et al. *Crohn's disease of the upper gastrointestinal tract*. Neth J Med. 1997;50(2):S2-7.
83. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, et al. *Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study*. Gastroenterology. 1976 Mar;70(3):439-44.
84. JSatsangi, MSSilverberg, SVermeire, J-FColombel. *The Montreal classification of inflammatory bowel disease :controversies, consensus, and implications*. Gut.2006 June; 55(6): 749–753.
85. Craig Mowat, Andrew Cole, Al Windsor. *Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults* Gut (2011). doi:10.1136/gut.2010.224154
86. Buğra Tolga Konduk, Saadettin Hülal. *İnflamatuvar barsak hastalıklarında tanı*. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2005;1(34): 16-53
87. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. *C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 2004;10:661-5.

88. Kozuch PL, Hanauer SB. *Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy.* World J Gastroenterol. 2008 Jan 21;14(3):354-77.
89. Desreumaux P, Ghosh S. Review article: *mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid new evidence.* *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 Suppl 1: 2-9.
90. Chetrit BE, Levy M. Familial Mediterranean Fever. *Lancet* 1998; 351: 659-664.
91. Sav T, Özbakır Ö, Keleştimur F, et al. *Adrenal axis functions in patients with familial mediterranean fever.* *Clin Rheumatol* 2006; 25:458-461.
92. Timmann C, Mersinli O, Kuhne K, et al. *Familial mediterranean fever with amiloidosis associated with novel exon 2 mutation (S1791) of the MEFV gene.* *Blood Cells, Molecules and Diseases* 31 2003:320-323.
93. Tunca M, Akar S, Onen F, et al. Turkish FMF study group. *Familial Mediterranean Fever in Turkey: results of a nationwide study.* *Medicine* 2005; 84(1): 1-11.
94. Sohar E, Gafni J, Pras M, et al. *Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature.* *Am J Med* 1967; 43(2):227-253.
95. Gök, E. Ailevi Akdeniz Atesi Tanısı ile izlenen Prepubertal Çocuklarda Kemik Mineral içeriğinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul, (2006)
96. Majeed HA, Barakat M, 'Familial Mediterranean Fever in children: analysis of 88 cases', *Eur. J Pediatr* . 1989; 148:636-41 .
97. Yesilada E., Savacı S., Yüksel Set al. *Ailesel Akdeniz Atesi (FMF) Düşünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları,* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2005; 5;12: 235-238 .
98. Bakkaloglu A. *Familial Mediterranean fever* *Pediatr Nephrol.* 2003; 18:853-859 .

99. Akin H, Onay H, Turker E, Cogulu O, Ozkinay F. MEFV mutations in patients with familial Mediterranean fever from the Aegean region of Turkey. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 93-98.
100. French FMF consortium. A candidate gene for Familial Mediterranean Fever. *Nat Genet* 1997; 17(1): 25-31.
101. Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, et al. *Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift*. *Eur J Hum Genet* 2001; 9; 634-637.
102. Samuels J, Aksentijevich I, Torlsyan Y. et al. *Familial Mediterranean Fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health*. *Medicine (Baltimore)* 1998; 77(4): 268-297.
103. Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, et al. *Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF)*. *Eur J Hum Genet* 1998; 6(1): 95-97.
104. Padeh S. *Periodic fever syndromes*. *Pediatr Clin N Am* 2005; 52:577-609.
105. Gang N, Drenth JP, Langevitz P, et al. *Activation of the cytokine network in familial mediterranean fever*. *J Rheumatol* 1999; 26:890-897.
106. Bakkaloğlu A. *Familial Mediterranean fever*; *Pediatric Nephrol* 2003; 18:853-859.
107. Pras M, Kastner DL. *Familial Mediterranean fever*. In: Klippel JH, Dieppe PA eds. *Rheumatology*, 2nd ed, London: Mosby, 2000; 5: 23.1- 4.
108. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. *Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever*. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (10): 1879-1885.
109. Grateau G, Pecheux C, Cazeneuve C, et al. *Clinical versus genetic diagnosis of familial Mediterranean fever*. *QJM* 2000; 93(4): 223-229.
110. Konstantopoulos K, Michael S, Kanta A, et al. *Renal amyloidosis as a first manifestation of familial Mediterranean fever*. *Scand J Rheumatol* 2000; 29(2):129-130.

111. Nir-Paz R, Ben-Chetrit E, Pikarsky E, et al. *Unusual presentation of familial Mediterranean fever: role of genetic diagnosis*. Ann Rheum Dis 2000; 59(10): 836-838.
112. Çiğdem Yıldız, *Homozigot 148Q Varyantına Sahip Ailevi Akdeniz Ateşi Vakalarında ve Sağlıklı Toplumda DNA MEFV Gen Analizi ve E148Q Allel Sıklığının Taranması*, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nefroloji Bilim Dalı, Ankara, 2013.
113. Goldfinger SE. *Colchicine for familial Mediterranean fever*. N Eng J Med 1972; 287(25): 1302.
114. Mamou H. *La Maladie Periodique*. L'Expansion Scientifique Française. Paris, 1956.
115. E, Bergmann S, Sood R. *Mechanism of the antiinflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new Outlook through microarray analysis*. Rheumatology (Oxford) 2006; 45(3): 274-282.
116. Rigante D, La Torraca I, Avallone L, et al. *The pharmacologic basis of treatment with colchicine children with familial Mediterranean fever*. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2006; 10(4): 173-178.
117. Onen F. *Familial mediterranean Fever*. Rheumatol Int 2006; 26 (6): 489-496.
118. Akgul O, Kilic E, Kilic G, et al. *Efficacy and Safety of Biologic Treatments in Familial Mediterranean Fever*. Am J Med Sci 2012; 0(0):1-5.
119. Özdoğan H. *Ailesel Akdeniz Ateşi*, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Romatolojik hastalıklar 2003; 34:63-66.
120. Kavak U.S, Özen S. *Ailesel Akdeniz Ateşi*. Sted 2003; 12:137-141.
121. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, 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: 553-555.

122. İç Hastalıkları..İliçin,Biberoğlu,Süleymanlar.2.Baskı Cilt 2 sayfa 2779-2784.
123. Tekin M, Yalçınkaya F, Turner N, et al. *Familial Mediterranean fever and acute rheumatic fever: A pathogenetic relationship?*. Clin Rheumatol. 1999;18:446-449.
124. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, et al. *The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalises with actin filaments*. Blood. 2001;98:85.
125. Bernot A, da Silva C, Petit J.L et al. *Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF)*. Hum Mol Genet;7:1317-1325 (1998) .
126. Touitou I. *The spectrum of familial Mediterranean fever (FMF) mutations*. Eur J Hum Genet; **9**: 473–83 (2001).
127. El-Shanti H., Abdel Majeed H., El-Khateeb M. *Familial Mediterranean fever in Arabs*. Lancet. 2006; 367: 1016–24.
128. Centola M, Wood G, Frucht DM, et al. *The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators*. Blood. 2000; 95: 3223–31.
129. Matzner Y, Abedat S, Shapiro E, et al. *Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures*. Blood. 2000; 96: 727–31.
130. Örün E,Yalçınkaya F.*Türk Tıbbında Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı ve Amiloidoz*. Türk Nefroloji Diyaliz ve transplantasyon dergisi 2003;12:1-7.
131. Chaabouni H.B,Ksantini M,M'rad R,et al. *MEFV Mutations in Tunisian Patients Suffering from Familial Mediterranean Fever*. Semin Arthritis Rheum 36:397-401.
132. Eldad Ben-Chetrit,Micha Levy. *Familial Mediterranean Fever*, Lancet 1998;351:659-64.

133. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, et al. *'Familial Mediterranean fever at the Millennium Clinical spectrum ancient mutations and a survey of 100 American referrals to the National institutes of Health.* Medicine. 1998; 77:268-97.
134. Özen, S., Besbas, N., Bakkaloglu, A,et al.*Pyrin Q148 mutation and familial Mediterranean fever.* QJM. 2002; 95: 332-333.
135. Papadopoulos VP, Giaglis S, Mitroulis I et al. *The Population Genetics of Familial Mediterranean Fever: A Meta-Analysis Study.* Ann Human Genet 2008; 72(6): 752-761.
136. Centola M, Wood G, Frucht DM, et al. *The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators.* Blood 2000; 95: 3223-3231.
137. Diaz A, Hu C, Kastner DL, et al. *Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever.* Arthritis and Rheumatism 2004; 50: 3679-3689.
138. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. *Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy.* Br J Haematology 2009; 146(5), 467-478.
139. Fairbrother WJ. , Gordon NC. , Humke EW. et al. *The PYRIN domain: a member of death domain-fold superfamily:* Protein Sci. 2001; 10: 1911-1918
140. Chae, JJ. , Komarow H.D. Cheng J et al. *Targeted disruption of pyrin, the FMF protein causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis.* Molecular Cell. 2003; 11:591-604
141. McDermott M. F. *A common pathway in periodic fever syndromes* TRENDS in Immunology. 2004; 25;9 .
142. Staub, E., Dah E. , Rosenthal, A. *Trends Biochem. Sci.* 2001; 26, 83–85

143. T Pawson and P Nash. *Protein-protein interactions define specificity in signal transduction*. Genes & Development. 2000;14(9):1027–1047.
144. K Hofmann. *The modular nature of apoptotic signaling proteins*. Cellular and Molecular Life Sciences. 1999;55(8-9):1113–1128.
145. A G Murzin, S E Brenner, T Hubbard, et al. *SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*. Journal of Molecular Biology. 1995; 247(4):536–540 .
146. E Liepinsh, R Barbals, E Dahl, et al. *The death domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition*. Journal of Molecular Biology. 2003; 332(5):1155–1163 .
147. Ting J.P.Y, Kastner D.L., Hoffman H.M. *CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY* . 2006;6:183-195 .
148. Grimaldi M., Candore G., Vasto S., et al. *Role of the pyrin M694V (A2080G) allele in acute myocardial infarction and longevity: a study in the Sicilian population*’ Journal of Leukocyte Biology,(2006).
149. McDermott, M. F. *Genetic clues to understanding periodic fevers, and possible therapies*. Trends Mol. Med. 2002; 8: 550–553 (2002).
150. KESİKLİ SA, GÜÇ D, *Steril İnflamasyon ve İnflamazom*. ANKEM Derg. 2011; 25: 102-109 .
151. Ben-Chetrit E, Levy M. *Familial Mediterranean fever*. Lancet, 1998; 351:659- 664.
152. Notarnicola C, Didelot MN, Kone-Paut I, et al. *Reduced MEFV messenger RNA expression in patient with familial Mediterranean fever*. Arthritis Rheum, 2002;46(10): 2785-2793.
153. Barakat MH, Malhas LN, Gumaa KK. *Catecholamine metabolism in recurrent hereditary polyserositis. Pathogenesis of acute inflammation: The retention leakage hypothesis*. Biomed Pharmacother 1989; 43: 763-69.

154. Fonnesu C, Cerquaglia C, Giovinale M. et al. *Familial Mediterranean Fever: A review for clinical management*. Joint Bone Spine 2009; 76: 227-233.
155. Richards N, Schaner P, Diaz A, et al. *Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis*. J Biol Chem 2001; 276(429, 39320-39329.
156. Martinon F, Burns K, Tschopp J. *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1beta*. Molecular Cell 2002; 10(2): 417-426.
157. Agostini L, Martinon F, Burns K, et al. *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. Immunity 2004; 20(3): 319-325.
158. Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, et al. *An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome*. Nat Immunol 2009;10(3): 266-272.
159. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. *AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC*. Nature 2009; 458(7237):514-518.
160. Papin S, Cuenin S, Agostini L et al. *The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing*. Cell Death and Differentiation 2007;14:1457–1466. [PubMed: 17431422]
161. Demirtürk L, Ozel AM, Cekem K, et al. *Co-existence of Helicobacter Pylori on the frequency and severity of FMF attacks*. Dig Liver Dis 2005; 37: 153-8.
162. Chae JJ, Wood G, Masters SL, et al. *The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006;103:9982–9987. [PubMed: 16785446]

163. Miggin SM, Palsson-McDermott E, Dunne A, Jefferies C, Pinteaux E, Banahan K, Murphy C, Moynagh P, Yamamoto M, Akira S, Rothwell N, Golenbock D, Fitzgerald KA, O'Neill LA. NF-kappaB activation by the Toll-IL-1 receptor domain protein MyD88 adapter-like is regulated by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:3372–3377. [PubMed: 17360653]
164. Seshadri S, Duncan MD, Hart JM, et al. *Pyrin levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1beta processing and release.* *J Immunology* 2007; 179(2): 1274-1281.
165. Yu JW, Fernandes-Alnemri T, Datta P Wu et al. *Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants.* *Molecular Cell.* 2007; 28(2): 214-227.
166. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, et al. *Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes.* *Cell* 1999;97:133–44.
167. Houten SM, Kuis W, Duran M, et al. *Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome.* *Nat Genet* 1999;22:175–77. [PubMed: 10369261]
168. Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, et al. *Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group.* *Nat Genet* 1999;22:178–81. [PubMed: 10369262].
169. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, et al. *Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome.* *Nat Genet* 2001;29:301–5. [PubMed: 11687797]
170. Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF et al. *TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes.* *Curr Opin Immunol* 2000;12:479–86. [PubMed: 10899034]

171. Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 2005;201:1479–86. [PubMed: 15851489].
172. Thomas KT, Feder HM Jr, Lawton AR, Edwards KM. Periodic fever syndrome in children. *J Pediatr* 1999;135:15–21. [PubMed: 10393598]
173. Shoham NG, Centola M, Mansfield E, Hull KM, Wood G, et al. *Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13501–6. [PubMed: 14595024]
174. Ferguson PJ, El-Shanti HI. *Autoinflammatory bone disorders.* *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:492–98. [PubMed: 17762617]
175. Feldmann J, Prieur AM, Quartier P, et al. *Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes.* *Am J Hum Genet* 2002;71:198–203. [PubMed: 12032915]
176. Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M, et al. *De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases.* *Arthritis Rheum* 2002;46:3340–48. [PubMed: 12483741]
177. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, et al. *Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica.* *Science* 2008;320:674–77. [PubMed: 18403674]
178. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS et al. *The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:9035–40. [PubMed:18577586].

179. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization*. Nat Immunol 2008;9:847–56. [PubMed: 18604214].
180. McGonagle D, McDermott MF. *A proposed classification of the immunological diseases*. PLoS Med 2006;3:e297. [PubMed: 16942393].
181. Christian M. Hedrich. *Genetic Variation and Epigenetic Patterns in Autoimmunity*. J Genet Syndr Gene 2011; 2:1
182. Mamou, H.; Cattan, R. *Sem. Ho. Paris*, 1952; 28, 1061-1070.
183. Sohar, E. , Gafni, J. , Pras, M. et al. *Am. J. Med.*, 1967; 43, 227-253.
184. Tunca, M. , Kirkali G. , Soy Turk M. et al. *Lancet*, 1999; 353, 1415.
185. Hazenberg B.P.C. , Limbyrg P.C. , Bijzet, J. et al *Ann. Rheum. Dis.*, 1999; 58, 96-102.
186. Lachmann H.J. , Booth D.R. , Booth S.E. et al. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2000, 18, 72.
187. Poland D.C.W. , Drenth J.P.H. , Rabinovitz E. et al. *Ann. Rheum. Dis.*, 2001, 60, 777-780.
188. Daniel Cattan. *MEFV Mutation Carriers and Diseases Other than Familial Mediterranean Fever: Proved and Non-Proved Associations; Putative Biological Advantage. Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*. 2005; 4, 105-112.
189. www.turkpediatri.com
190. Prof. Dr. Meral Çalgüneri Romatoid artrit *Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, iç hastalıkları, Romatoloji Bilim Dalı*.
191. Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, et al. *Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial mediterranean fever*. Am J Hum Genet. 2000; 67:1136-1143.
192. Shinar Y. , Livneh A. , Villa Y. , et al. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2002, 20, S75.

193. Klug W . , and M. , Cummings (2000).Genetik Kavramlar.
194. Akar N. , (1999). Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş (Geniştirilmiş ikinci baskı). Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ank Tıp A.S Yayınları.
195. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR. et al. *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science . 2006; 314: 1461–1463.
196. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P. et al. *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet. 2007; 39: 207–211.
197. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. *Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis*. Nat Genet. 2007; 39:596–604.
198. Libioulle C, Louis E, Hansoul S. et al. *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. PLoS Genet. 2007; 3: e58.
199. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. *Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility*. Nat Genet 2007; 39: 830–832.
200. Wellcome Trust Case Control Consortium .*Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. Nature 2007; 447: 661–678.
201. Milhavet F, Cuisset L, Hoffman HM, et al. *The infivers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions*. Hum Mutat . 2008; 29: 803–808.
202. Mariathasan S, Monack DM. *Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation*. Nat Rev Immunol. 2007; 7:31–40.

203. Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, et al. *The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity*. Curr Opin Immunol. 2007; 19:615–622.
204. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. Cell Death Differ 2007; 14: 10–22.
205. Chae JJ, Wood G, Richard K, et al. *The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NFkappaB through its N-terminal fragment*. Blood 2008; 112: 1794–1803.
206. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, et al. *Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16*. N Engl J Med. 1992; 326: 1509–1513.
207. Lichtenberger GS, Flavell RA, Alexopoulou L. *Innate immunity and apoptosis in IBD*. Inflamm Bowel Dis. 2004; 10: S58–S62.
208. Flatau E, Kohn D, Schiller D, et al. *Schonlein-Henoch syndrome in patients with familial Mediterranean fever*. Arthritis Rheum. 1982; 25: 42–7.
209. Ozen S, Ben Chetrit E, Bakkaloglu A, et al. *Polyarteritis nodosa in patients with familial Mediterranean fever (FMF): A concomitant disease or a feature of FMF?* Semin Arthritis Rheum. 2001; 30:281–7.
210. Schwartz T, Langevitz P, Zemer D et al. *Behcet's disease in familial Mediterranean fever: Characterization of the association between the two diseases*. Semin.Arthritis Rheum 29: 286–95, 2000.
211. Orchard TR, Dhar A, Simmons JD, et al. *MHC class I chain-like gene A (MICA) and its associations with inflammatory bowel disease and peripheral arthropathy*. Clin Exp Immunol. 2001; 126: 437–40.
212. Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, et al. *A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the*

disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. Tissue Antigens 2001; 57: 9–14.

213. Touitou I. , Picot MC. , Domingo C. , et al. The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 44: 163–9, 2001.
214. Karban A, Dagan E, Eliakim R, et al. *Prevalence and significance of mutations in the familial Mediterranean fever gene in patients with Crohn's disease.* Genes Immun. 2005; 6: 134–139.
215. Renda MC, Civitavecchia G, Fabiano C. et al. *Familial Mediterranean Fever Gene (MEFV) Mutations in Crohn's disease in a Mediterranean Area.* Inflamm Bowel Dis ,2008; 14:9.
216. Yıldırım B. , Tuncer C. , Kan D. et al. *MEFV gene mutations and its impact on the clinical course in ulcerative colitis patients.* Rheumatol Int. 2011; 31:859–864.
217. Beşer Ö. Kasapçopur Ö. Çokuğraş F. et al. *Association of Inflammatory Bowel Disease With Familial Mediterranean Fever in Turkish Children.* JPGN 2013;56: 498–502.
218. Filiz Akyuz, Fatih Besisik, Duran Ustek. *Association of the MEFV Gene Variations With Inflammatory Bowel Disease in Turkey.* J Clin Gastroenterol. 2013;47:e23–e27.
219. Villani A-C, Lemire M, Louis E, et al. *Genetic Variation in the Familial Mediterranean Fever Gene (MEFV) and Risk for Crohn's Disease and Ulcerative colitis.* PLoS ONE 2009 ;4(9): e7154. doi:10.1371/journal.pone.0007154.
220. Zarife Kuloglu, Aydan Kansu, Gonca Üstündağ. *An infant with severe refractory Crohn's disease and homozygous MEFV mutation who dramatically responded to colchicine.* Rheumatol Int:2009; DOI 10.1007/s00296-009-1326-4

