

TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA
OTOENFLAMASYONUN İNCELENMESİ

Pınar Özge AVAR AYDIN

İmmünoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2023

TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA
OTOENFLAMASYONUN İNCELENMESİ

Pınar Özge AVAR AYDIN

İmmünoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Deniz Nazire ÇAĞDAŞ AYVAZ

ANKARA
2023

ONAY SAYFASI

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Otoinflamasyonun İncelenmesi

Öğrenci: Pınar Özge AVAR AYDIN

Danışman: Prof. Dr. Deniz Nazire ÇAĞDAŞ AYVAZ

Bu tez çalışması 05.06.2023 tarihinde jürimiz tarafından “İmmünoloji Yüksek Lisans Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Ayşe METİN*

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Çocuk Alerji İmmünoloji Bilim Dalı

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Deniz Nazire ÇAĞDAŞ AYVAZ*

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Alerji İmmünoloji Bilim Dalı

Üye: *Prof. Dr. Selin AYTAÇ EYÜPOĞLU*

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Alerji İmmünoloji Bilim Dalı

Üye: *Doç. Dr. Hande CANPINAR*

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Bilim Dalı

Üye: *Doç. Dr. Sevil OSKAY HALAÇLI*

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Alerji İmmünoloji Bilim Dalı

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

1.2 Haziran 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

05/06/2023

(İmza)

Öğrencinin Adı SOYADI

Pınar Özge AVAR AYDIN

^{1a}“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılmamış durumda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Deniz Nazire ÇAĞDAŞ AYVAZ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Ünvanı (varsa). Adı SOYADI
(İmza)
Uz. Dr. Pınar Özge AVAR AYDIN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, birikim ve tecrübesiyle yoluma ışık tutan, bilimsel merak ve emeğin zorlukları aşmadaki en önemli güç olduğuna ve bu temelde her şeyin yapılabilir olduğuna inandıran, tezimin tüm aşamalarında sonsuz desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Deniz Nazire ÇAĞDAŞ AYVAZ'a teşekkür ederim. Desteği, inancı ve pozitif enerjisiyle en zorlu zamanlarımda yanımda olan, titiz çalışması ile örnek bilim insanı sayın Araş. Gör. İsmail YAZ'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans dönem arkadaşım, biricik kardeşim Dilan İNAN'a bana bu yolda yoldaş olduğu, her daim desteklediği ve sonsuz dostluğunu paylaştığı için teşekkür ederim. Romatoloji yandal eğitim sürecimde İmmünoloji'ye duyduğum merakı, ilgiyi, bu eğitimi almamı destekleyen hocalarım sayın Prof. Dr. Fatoş YALÇINKAYA, Prof. Dr. Nilgün ÇAKAR ve Prof. Dr. Zeynep Birsin ÖZÇAKAR'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisansım süresince, tüm yoğunluğuna rağmen, desteğini ve emeklerini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Sevil OSKAY HALAÇLI'ya teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisans dönem arkadaşlarım sevgili Ceren BOZKURT ve Sidem Didar TEKEOĞLU'na hep yanımda oldukları, derdi, sevinci, gençlikleri ve enerjilerini paylaştıkları için çok teşekkür ederim. Derslerini almakla kendimi şanslı saydığım, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sayın Prof. Dr. İlhan TEZCAN, Prof. Dr. Seza ÖZEN, Prof. Dr. Pınar ÖZDEMİR, Doç. Dr. Baran ERMAN ve tüm program hocalarıma teşekkür ederim. Beni bugünlere getirmek için cansiperane emek harcayan, hep yanımda olan başta annem olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim. Bu tez çalışmamı canım anneme ve biricik kızıma adıyorum.

İlk ve son söz olarak, bir Cumhuriyet kadını ve bilim insanı olarak yetişmemdeki en önemli pay sahibi, Türkiye Cumhuriyeti'nin kurucusu ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK'ün aziz hatırası önünde saygıyla eğilerek minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Pınar Özge AVAR AYDIN

Ankara, 01.06.2023

ÖZET

Avar Aydın, PÖ. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Otoenflamasyonun İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) en sık görülen otoenflamatuvar hastalıktır. Mevcut çalışmalar, GSDMD'nin otoenflamasyondaki rolüne ve hastalık atağındaki moleküler değişikliklere dair kısıtlı bilgiler içermektedir. Bu çalışmada, AAA ataklarında meydana gelen enflamasyonda rol oynayan GSDMD, IL-1B ve IL-18 seviyelerinin atak arası dönem, sağlıklı kontrol ve kronik hastalığı olmayan ateşli çocuklarla kıyaslanarak ataktaki enflamatuvar moleküllerin değişikliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya AAA tanılı hastalar atak ve atak arası dönemde, sağlıklı çocuklar ve kronik hastalığı olmayıp akut enfeksiyon ile başvuran hastalar dahil edildi. Gasdermin-D gen ekspresyonu RNA izolasyonu sonrası RT-PCR ile ölçüldü. İnterlökin-1B ve IL-18 düzeyleri ELISA ile değerlendirildi. Toplamda 16 AAA hastası atak ve atak arası dönemde, on sağlıklı çocuk ve sekiz akut enfeksiyon nedeni ateşi olan çocuk çalışmaya dahil edildi. Biri hariç tüm AAA hastaları *MEFV* geninde ekzon 10 mutasyonu taşıyıcısıydı. Atak döneminde GSDMD gen ifadesinin diğer gruplara göre belirgin arttığı, IL-1B ve IL-18 düzeyinin ise atak ve atak arası dönemde yüksek ve benzer düzeylerde olduğu bulundu. Hastalık atağında GSDMD gen ekspresyonu akut faz proteinleri ile anlamlı korelasyon gösterdi. Kolşisin tedavisi ile IL-1B ve IL-18 düzeylerinde belirgin düşüş saptandı. Genotipe göre bu moleküllerde anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Ateşli kontrol grubunda, viral enfeksiyonlarda bakteriyel enfeksiyonlara göre daha yüksek olmak üzere, GSDMD düzeylerinde artış gözlemlendi. Ailevi Akdeniz ateşinde atakların oluşumunda GSDMD kritik özelliktedir. İnterlökin-1B ve IL-18 atak ve atak arası dönemde yüksektir ve kronik enflamasyonun göstergesi olabilir. Genotip ile bu moleküller arasında belirgin bir ilişki bulunmaz.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz ateşi, otoenflamasyon, gasdermin-D, IL-1B

Desteği Olan Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Hızlı Destek Projesi (THD-2022-20098)

ABSTRACT

Avar Aydın, PO. The Determination of Autoinflammation in Patients with Familial Mediterranean Fever. Hacettepe University, Graduates School of Health Sciences, Immunology Program, Master's Thesis, Ankara, 2023. Familial Mediterranean Fever (FMF) is the most common autoinflammatory disease. The aim of this study is to determine the changes of GSDMD, IL-1B, and IL-18 in disease attacks of FMF and to compare their levels in the attack-free periods, healthy controls, and febrile controls without a chronic disease. Patients with a diagnosis of FMF were included in the study during attack and attack-free periods. Healthy children as the control group and febrile children without a chronic disease as the febrile control group were added. Gasdermin-D gene expression was measured by the RT-PCR. Interleukin-1B and IL-18 levels were quantified by the ELISA. A total of 16 FMF patients, 10 healthy children, and eight children with a febrile infection were included in the study. All but one patients with FMF were carriers of an exon 10 mutation in the *MEFV* gene. It was found that GSDMD gene expression increased significantly during disease attacks compared to the other groups. The levels of IL-1B and IL-18 were found to be high and at similar levels both at the attack and attack-free periods. Gasdermin-D gene expression showed a significant correlation with acute phase reactants at the disease attack. After colchicine, a significant decrease was found in IL-1B and IL-18 levels. No significant difference was detected in these molecules according to the *MEFV* genotype. An increase in GSDMD levels was observed in the febrile control group, with viral infections being higher than bacterial infections. Gasdermin-D is critical in the pathogenesis of disease attacks in FMF. Interleukin-1B and IL-18 are high at the attack and between the attacks that they might be an indicator of chronic inflammation. There is no significant relationship between these molecules and the *MEFV* genotype.

Keywords: Familial Mediterranean fever, autoinflammation, gasdermin-D, IL-1B

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enflamazom ve Otoenflamasyon	3
2.2. Otoenflamatuvar Hastalıklar	6
2.3. Pirin Enflamazomu ve Pirin İlişkili Otoenflamatuvar Hastalıklar	8
2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi	12
2.4.1. Tanımlama ve Genel Bilgiler	12
2.4.2. Genetik	13
2.4.3. Patogenez	14
2.4.1. Klinik, Laboratuvar Bulguları ve Tanı Ölçütleri	17
2.5. Çalışmanın Hipotezi ve Amacı	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Çalışma Popülasyonu	20
3.2. Yöntemler	20
3.2.1. Gasdermin-D Ekspresyonunun Ölçümü	21
3.2.2. İnterlökin-1B ve İnterlökin-18 Düzeylerinin Ölçümü	25
3.2.3. İstatistiksel Analizler	26
4. BULGULAR	27
4.1. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarının Demografik, Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	27
4.2. Kontrol Gruplarının Demografik, Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	28
4.3. Çalışma Gruplarında Gasdermin-D, IL-1B ve IL-18 Düzeyleri ve Gruplararası Karşılaştırma	29

4.4. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Genotip, Laboratuvar Bulguları ve Kolşisin Tedavisi ile Gasdermin-D, IL-1B ve IL-18 Düzeylerinin İlişkisi	32
5. TARTIŞMA	34
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
7. KAYNAKLAR	38
8. EKLER	46
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Yüksek Lisans Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü	
EK-3: Orijinallik Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	49



SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA	Ailevi Akdeniz ateşi
ASC	Apoptosis related speck-like protein containing caspase activation and recruitment domain
BIR	Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat
CAPS	Kriyopirin-ilişkili periyodik ateş sendromu
CARD	Caspase activation and recruitment domain
C-C	Coil-coil domain
CRP	C-reaktif protein
DAMP	Hasar-ilişkili moleküler patern
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplazmik retikulum
ESH	Eritrosit çökme hızı
FMF	Familial Mediterranean fever
GSDMD	Gasdermin-D
Rho GTPaz	Rho guanozin trifosfataz
IL	İnterlökin
IL-1B	IL-1 beta
IL-1Ra	IL-1 reseptör antagonisti
IL-18BP	IL-18 bağlayıcı protein
IQR	Çeyrekler arası aralık (Interquartile range)
LRR	Leucine-rich repeats
MEFV	MEditerranean FeVer
MKD	Mevalonat kinaz eksikliği
NAIAD	NLRP1-ilişkili otoenflamasyon, artrit ve diskeratoz
NAIP	NLR family apoptosis inhibitory protein
NET	Nötrofil ekstrasellüler tuzaklar
PAAND	Pirin-ilişkili otoenflamasyon ve nötrofilik dermatoz
PAMP	Patojen-ilişkili moleküler patern

PAPA	Piyojenik artrit-piyoderma gangrenozum-akne hastalığı
PKN	Protein kinaz
PRR	Patern-tanıyıcı reseptör
PYD	PYRIN domain
RT-PCR	Real-time polimeraz zincir reaksiyonu
SSS	Standart sapma skorları
TNF	Tümör nekrotize edici faktör
TRAPS	Tümör nekrotize edici faktör reseptörü-ilişkili periyodik sendrom



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Enflamazomun yapısal şematizasyonu	3
2.2. Farklı enflamazomların yapısal şematizasyonu	4
2.3. Pirin proteininin yapısal şematizasyonu, etkileşime girdiği moleküller ve etkileri	8
2.4. Pirin enflamazomunun oluşumu	10
2.5. Pirin ilişkili Otoenflamatuvar Hastalıklar	11
2.6. MEFV geni ve pirin proteini	14
3.1. RT-PCR’da verilerin kantifikasyonu	25
4.1. Çalışma gruplarında Gasdermin D ifade seviyeleri ve IL-1B düzeyleri	29

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Enflamazomlar ve İlişkili Monogenik Otoenflamatuvar Hastalıklar	5
2.2. İnterlökin-1B'nın majör sistemik etkileri	7
4.1. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarının ataktaki klinik ve laboratuvar özellikleri	28
4.2. Çalışma gruplarında laboratuvar bulgularının kıyaslanması	31
4.3. Atak ile başvuran ailevi Akdeniz ateşi hastalarında laboratuvar parametreleri arasındaki korelasyon	32
4.4. Kolşisin tedavisi kullanan ve henüz başlanmayan hastalarda IL-1B, IL-18 ve Gasdermin-D düzeyleri	33

1. GİRİŞ

Enflamasyon, evrimsel olarak korunmuş olan doğal immün sistemin zararlı bir uyarana karşı vücudu savunan immün yanıtıdır. Doğal immün sistem yanıtının oluşumu için, germ-line olarak kodlanan patern-tanıyıcı reseptörlerin (PRR) patojen-ilişkili moleküler paternleri (PAMP) veya hasar-ilişkili moleküler paternleri (DAMP) tanınması gerekmektedir. Patern-tanıyıcı reseptörlerin aktivasyonu ile enflamasyon tetiklenir, enflamazom oluşur ve proenflamatuvar sitokinler üretilir (1). Enflamazom oluşumu ile kaspaz-1 aktivasyonu, pro-interlökin-1B (IL-1B) ve pro-IL-18'in aktif hale dönüşümü, gasdermin-D (GSDMD) aracılı delik oluşumu ve piroptotik hücre ölümü görülür. Yüksek enflamasyon kapasitesi nedeniyle enflamazomu oluşturan sensörler posttranslasyonel kontrol mekanizmaları ile oldukça sıkı bir şekilde düzenlenir (2,3). Enflamasyon mekanizmalarındaki yetersizlikler patojenlerle kronik enfeksiyonlara yol açarken, aşırı enflamasyon otoenflamatuvar hastalıklara neden olur.

Otoenflamatuvar hastalıklar herhangi bir uyarandan olmaksızın ateş ve sistemik enflamasyon epizodlarının görüldüğü bir grup nadir hastalığı tanımlar ve doğal immün sistemin kontrolsüz aktivasyonu sonucu oluşur. Otoimmün hastalıkların karakteristik bulgusu olan yüksek titrede otoantikor oluşumu veya antijen-spesifik T hücreleri gibi adaptif immün sistem aktivasyon bulguları patogeneze primer olarak rol almaz (4). Otoenflamatuvar hastalıkların güncel sınıflamasında gen temelli sınıflamadan ziyade patogeneze göre sistem temelli bir sınıflama önerilmiştir ve hastalıklar enflamazomopatiler, aktinopatiler, interferenopatiler, NF-KB bozuklukları ile giden hastalıklar, protein katlanma bozuklukları ve endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkili hastalıklar olarak ayrılmıştır (5).

Tüm dünyada en sık görülen ve en iyi bilinen otoenflamatuvar hastalık ailevi Akdeniz ateşidir (6). Hastalık otozomal resesif geçiş gösterir. Pirin proteinini kodlayan *Mediterranean FeVer (MEFV)* genindeki işlevsel kazanım mutasyonları sonucu oluşur (7). Ailevi Akdeniz ateşi, pirin proteininin kontrolsüz aktivasyonu ile oluşan bir enflamazomopatidir. Kaspaz-1 aktivasyonu ile aktif IL-1B ve IL-18 üretimi olur ve membranda delik oluşumuna yol açan GSDMD aktifleşir. Böylelikle hücre içinde aktifleşen IL-1B ve IL-18 hücre dışına salınarak enflamasyona sebep olur, diğer

tarafından enflamatuvar hücre ölümü olan piroptozis başlar (8–10). Ayrıca hastalık ataklarında S100 alarmin proteinlerinin aşırı arttığı da gösterilmiştir (11). Nötrofillerden sitokin salınımına ek olarak nötrofil ekstrasellüler tuzaklar (NET) salınır. Nötrofil ekstrasellüler tuzaklar bir yandan enflamasyonu uyarırken diğer yandan negatif geri bildirim mekanizması ile enflamasyonu baskılar (12). Tüm bunların sonucu olarak hastalarda ateş ve poliserözitin görüldüğü, kendi kendini sınırlayarak 6-72 saat süren sistemik enflamatuvar ataklar görülür. Ailevi Akdeniz ateşi ilk tanımlanan ve en iyi bilinen otoenflamatuvar hastalık olmasına rağmen hastalık patogenezindeki moleküler yollar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada ailevi Akdeniz ateşi ataklarında meydana gelen enflamasyonda rol oynayan GSDMD, IL-1B ve IL-18 seviyelerinin atak arası dönem, sağlıklı kontrol ve kronik hastalığı olmayan ateşli çocuklarla kıyaslanarak ataktaki enflamatuvar moleküllerin değişikliğini belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca, ailevi Akdeniz ateşi genotipine göre bu enflamatuvar moleküllerdeki artış değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enflamazom ve Otoenflamasyon

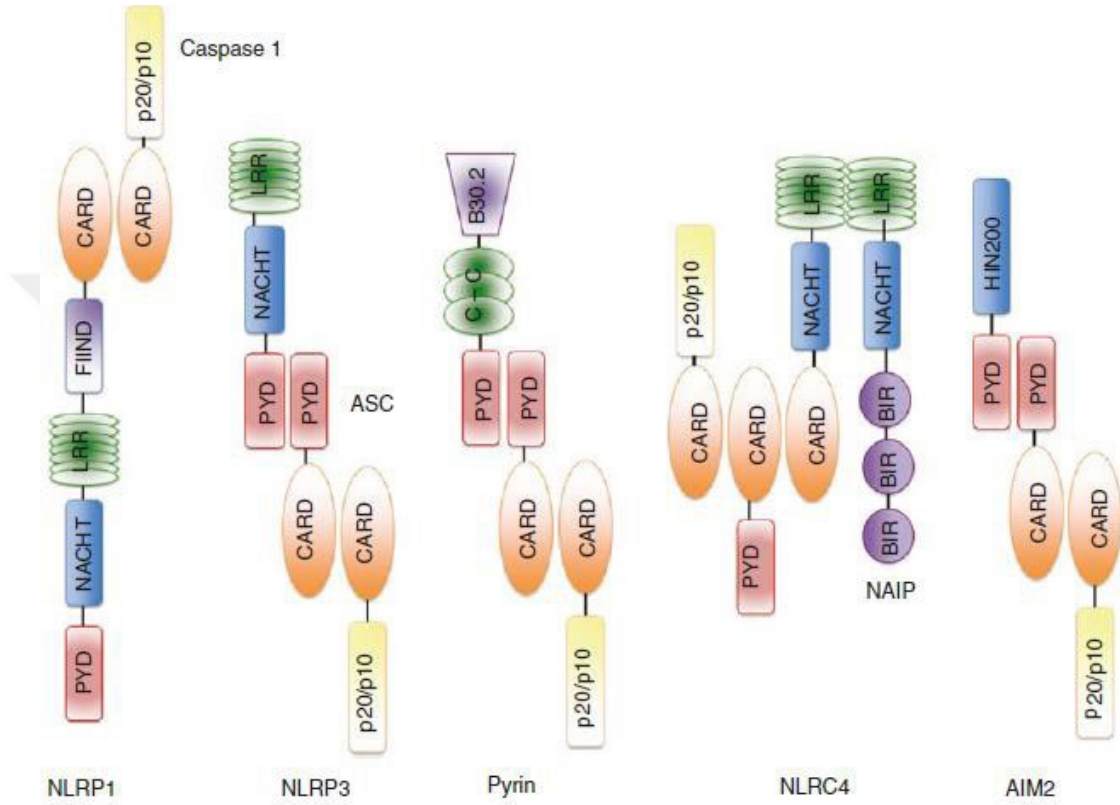
Enflamasyon, enfeksiyon ve doku hasarına karşı oluşan, patojenlerin eliminasyonunu sağlayan ve doku iyileşme sürecine katkı sunan fizyolojik bir yanıttır. Doğal immünitinin patojen ve metabolik tehlike sinyallerinin taşıdığı ortak yapıları spesifik reseptörler aracılığıyla tanınması ve hızlı yanıt oluşturmalarıyla meydana gelir. Patojenik (PAMP) veya metabolik hasar sinyalleri (DAMP) germ-line kodlanan reseptörler olan PRR'ler tarafından tanınır. Bu sinyaller, intrasellüler PRR'ler tarafından tanındıktan sonra enflamazom oluşumunu uyarır. Enflamazomlar, sensörler, adaptör proteinler ve kaspazlardan oluşan multiprotein polimerik komplekslerdir (Şekil 2.1). Aktifleştiklerinde pro-kaspaz ve pro-sitokinlerin kesilme işlemi ile aktivasyonunu sağlarlar. Kaspaz-1 aktif hale geçince sitokin ve alarminlerin salınmasına ve proenflamatuvar hücre ölümü olan piroptozise neden olur (13,14).



Şekil 2.1. Enflamazomun yapısal şematizasyonu

Enflamazomlar üç ayrı molekülden oluşur: sensör molekül (kompleksin adını veren tanıyıcı molekül), adaptör molekül (apoptosis related speck-like protein containing caspase activation and recruitment domain, ASC) ve efektör molekül olan kaspaz. Enflamazom sensörleri NOD-like reseptör (NLR) veya AIM2-benzeri reseptör ailelerindendir. Bu sensörler PYRIN-NACHT-LRR bölgelerinin yerleşimine göre ayrılır (Şekil 2.2). Enflamazom sensörleri aktif olduktan sonra pro-kaspaz-1'in aktif formuna dönüşümünü sağlayan adaptör ASC molekülünü ile birleşir (15). Gerçekleşen multimerizasyon, otoproteolize ve enzimatik olarak aktif subunitlerin oluşumuna neden olur. Aktif kaspaz-1, inaktif olan IL-1B ve IL-18 öncül formlarının enzimatik olarak parçalanmasına ve piroptozis oluşumuna neden olur. Aktif IL-1B ve IL-18 salınımı ek enflamatuvar moleküllerin salınımına yol açar. Sinyal transdüksiyonu, sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerin ekspresyonu ek enflamatuvar

hücrelerin olay yerine toplanmasına neden olur ve enflamatuvar kaskad oluşturur (16). Sensör moleküllerdeki işlevsel kazanım mutasyonları otoenflamatuvar hastalıklara (Tablo 2.1), işlevsel kayıp mutasyonları ise immün yetmezliğe neden olur. Ayrıca, PRR uyarımına neden olan ligandların temizlenmesindeki bozukluklar veya değişiklikler de otoenflamasyona neden olur.



(Hashkes PJ, Laxer RM, Simon A. (2019). Textbook of Autoinflammation)

Şekil 2.2. Farklı enflamazomların yapısal şematizasyonu

BIR baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat, CARD caspase activation and recruitment domain, C-C coil-coil domain, LRR leucine-rich repeats, NAIP NLR family apoptosis inhibitory protein, PYD PYRIN domain

Piroptosis enflamatuvar hücre ölümünün bir şeklidir. Nekroza benzer şekilde, hücre membranında oluşan delikten sitozolik komponentler hücre dışına çıkar ve hücresel şişme görülür (17). Piroptozisten asıl sorumlu molekül GSDMD'yi kesip aktif hale getiren kaspaz-1 ve kaspaz-11'dir (18). Gasdermin-D oligomerleri hücre membranına göç eder ve hücre membranında 10-15 nm çapında delik açar (19). Bu

deliklerden hücre dışına IL-1B ve IL-18 çıkar. Makrofaj içerisindeki bakterilerin dışarı çıkışı sağlanarak nötrofiller tarafından öldürülmeye açık hale gelir. Böylelikle, piroptosis hem enfeksiyonların yok edilmesinde hem de reaktif enflamatuvar yanıtın oluşturmada önemlidir (20). Bir yandan, enflamazom oluşumu sırasında hücre içinde oluşan ASC speckleri de hücre dışına çıkar. Bunlar ekstrasellüler alanda daha fazla pro-kaspaz-1 ve pro-IL-1B'nin işlenmesini sağlayan aktif enflamazomlar gibi işlev görür. Enflamatuvar sitokinler salınırken komşu hücreler bu hasar sinyallerini algılayarak enflamasyonun diğer hücrelere de yayılmasına neden olur (21,22). Bu mekanizmanın otoenflamatuvar hastalıklardaki kronik enflamatuvar yanıtın oluşmasında önemli olduğu düşünülmektedir.

Tablo 2.1. Enflamazomlar ve İlişkili Monogenik Otoenflamatuvar Hastalıklar

Enflamazom	İlişkili Proteinler	İlişkili Monogenik Otoenflamatuvar Hastalıklar	Referanslar
NLRP1	ASC Pro-kaspaz-1 Pro-kaspaz-5	NLRP1-ilişkili otoenflamasyon, artrit ve diskleratoz (NAIAD)	[23]
NLRP3	ASC Pro-kaspaz-1 Kaspaz-8	Kriyopirin-ilişkili/ NLRP3-ilişkili periyodik ateş sendromu (CAPS)	[24]
Pyrin	ASC Pro-kaspaz-1 14-3-3	Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) Pirin-ilişkili otoenflamasyon ve nötrofilik dermatoz (PAAND)	[25]
NLRC4	ASC Pro-kaspaz-1 NAIP	NLRC4-ilişkili otoenflamatuvar sendrom	[26]
NLRP6	ASC Pro-kaspaz-1	Henüz tanımlanmamış	[27]
NLRP7	ASC Pro-kaspaz-1	Henüz tanımlanmamış	[28]
NLRP12	ASC Pro-kaspaz-1	NLRP-12 ilişkili otoenflamatuvar sendrom	[29]
AIM2	ASC Pro-kaspaz-1	Henüz tanımlanmamış	[30]

Enflamatuvar reaksiyonlar pek çok aşamada sıkıca kontrol edilir. Bu kontrol mekanizmalarındaki yetersizlikler süregelen enflamasyona, persistan lokal doku hasarına ve/veya kronik enflamatuvar hastalıklara yol açabilir (23). Sensör proteinlerin ekspresyonu hem RNA düzeyinde hem de protein düzeyinde posttranslasyonel proteolizle kontrol edilir. Şaperonlar ve bağlayıcı proteinler enflamasyonda rol oynayan proteinleri inaktif durumda tutarak enflamazom yanıtının başlamasını engeller (24). Enflamazomun aktivasyonu proteinler arası domain oligomerizasyonuna bağlıdır. Bunlar, kaspaz-1, IL-1B ve IL-18'in matür, biyolojik olarak aktif formlarına dönüşümündeki proteolitik kesilme işlemini de içerir (25). Aktifleşen bu sitokinlerin etkilerini göstermesi kendi ilgili reseptörlerine bağlanmasına bağlıdır, böylelikle pozitif bir geri bildirim mekanizması devreye girer. Diğer taraftan IL-1B'nin ve IL-18'in yarışmalı inhibitörleri olan IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) ve IL-18 bağlayıcı protein (IL-18BP) sitokinlerin ilişkili reseptörlerine bağlanmasını engeller (26). Ek olarak, nötrofillerden enflamasyon esnasında salınan NET'ler de negatif geribildirim mekanizmasıyla enflamasyonun baskılanmasında etkilidir (27).

2.2. Otoenflamatuvar Hastalıklar

Otoenflamatuvar hastalıklar terimi, spontan enflamatuvar ataklarla giden bir grup hastalığı tanımlamak üzere ilk olarak kullanılmıştır (4). Herhangi bir uyaran olmaksızın doğal immün sistemin kontrolsüz aktivasyonu sonucu gelişen ateş ve enflamasyon ataklarını tanımlar. Çoğunda ataklar değişken periyotlarda görülür. Cilt, serözal membran, eklem, barsak ve diğer organları etkileyebilir ve uzun dönem komplikasyon olarak sekonder amiloidoz görülebilir. Bu hastalıkların çoğunda IL-1B'nin kontrolsüz salınımı sorumludur, bu nedenle IL-1 karşıtı tedaviler klinikte dramatik olarak bir iyileşme sağlar. Yakın dönemde hücrel stres, NF-kB sinyal mekanizmasında, tip 1 interferon üretiminde ve kompleman aktivasyonunda bozukluk gibi farklı otoenflamatuvar hastalıklarda çeşitli mekanizmalar da tanımlanmıştır. Herediter periyodik ateş sendromları ise, tekrarlayan ateş ve enflamasyonla giden bir grup monogenik bozukluğu tanımlamaktadır (6).

İlk sınıflama çalışmalarında genetik mekanizmalar hastalıkların ayırımında önemli bir unsur olarak görülmüştür (28). Zaman içerisinde patogeneizde rol oynayan

temel mekanizmalara göre sınıflandırma, hastalıkları gruplandırma ve yeniden isimlendirme üzerine çalışılmıştır (29). Son sınıflamada ise sistem temelli bir yaklaşım benimsenmiştir. Buna göre, doğal immün sistem hastalıkları; enflamazomopatiler, aktinopatiler, interferenopatiler, NF-kB bozuklukları ile giden hastalıklar, protein katlanma bozuklukları, ER-stresi ilişkili hastalıklar ve diğer hastalıklar şeklinde sınıflanmıştır. Sistem bazlı sınıflamanın hastalıkların anlaşılması ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine daha çok katkı sunması beklenmektedir (5). Gelecek nesil sekanslama ve hastalıklardaki biyoenformatik ilişkilerin daha iyi tanımlanması bu sınıflamanın geliştirilmesinde önemli olacaktır.

Enflamazomopatiler, monogenik geçiş gösteren otoenflamatuvar sendromları tanımlamaktadır. Bunlar; ailevi Akdeniz ateşi, pirin-ilişkili otoenflamasyon ve nötrofilik dermatoz (PAAND), mevalonat kinaz eksikliği ve NLRP3-, NLRP12-, NLRC4- ve NLRP1-ilişkili otoenflamatuvar hastalıklardır. Bu hastalıkların tümünün patogenezinde kaspaz-1 ve IL-1B artışı önemli olsa da klinik bulguları oldukça farklıdır (5). Klinikteki bu farklılıklar, hastalıklarda etkili olabilecek farklı moleküllerin ve mekanizmaların olduğunu düşündürmektedir. Patogeneizde önemli olan IL-1B'nin sistemik etkileri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

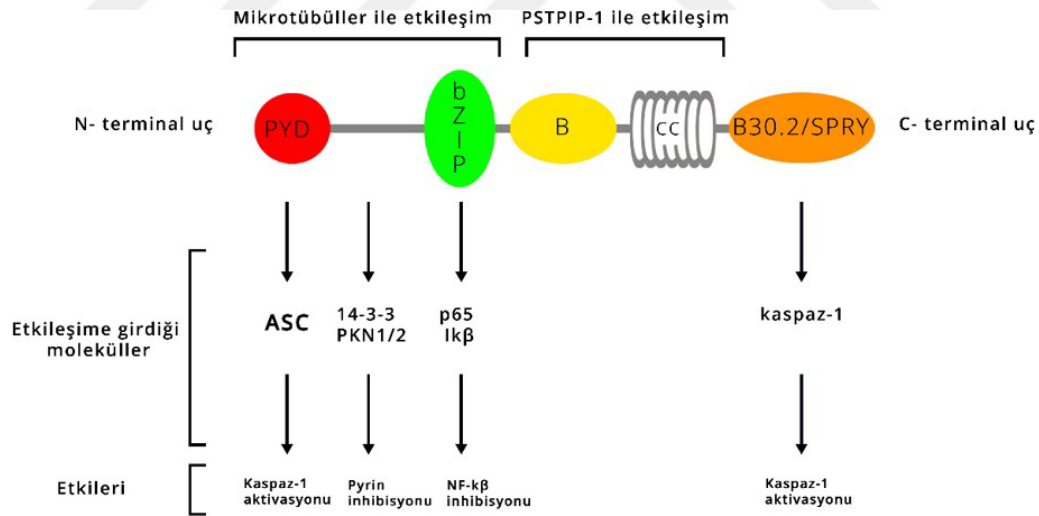
Tablo 2.2. İnterlökin-1B'nin majör sistemik etkileri

Organ	Etki
Hipotalamus	Siklooksijenaz tip 2 sentezi → prostaglandin-E2 üretiminde artış → termoregülatuvar merkezin uyarılması → ateş
Endotel	İnterlökin-6 indüksiyonu, döküntü
Karaciğer	İnterlökin-6 indüksiyonu → akut faz proteinlerinin sentezi
Kemik iliği	Granülosit öncüllerinin ve matür nötrofillerin artmış hareketi → periferik nötrofili Eritropoetin cevabında azalma → anemi İnterlökin-6 indüksiyonu → trombosit üretiminde artış → trombositoz

2.3. Pirin Enflamazomu ve Pirin İlişkili Otoenflamatuvar Hastalıklar

Pirin; granülositler, monositler ve sinoviyal ve peritoneal fibroblastlarda eksprese edilen 781 aminoasitten oluşan bir proteindir. Temel olarak fosforilasyon ile gerçekleşen inhibisyonla kontrol edilir. *MEditerranean FeVer* genindeki işlevsel kazanım mutasyonları pirin proteininin aktivasyonuna ve otoenflamasyona neden olur (7).

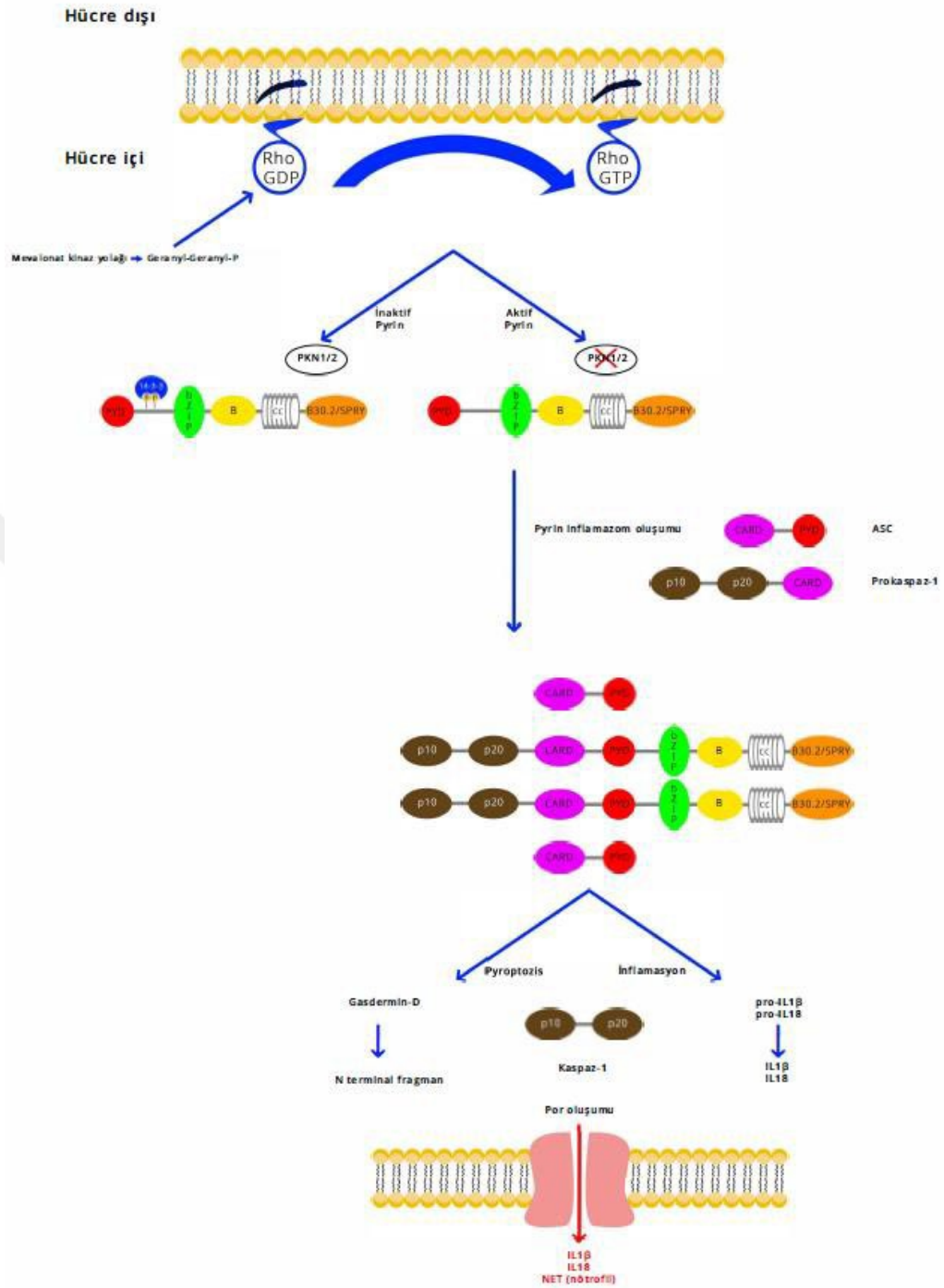
Pirin proteininin yapısı, ilişkili olduğu moleküller ve oluşan etkiler Şekil 2.3'te şematize edilmiştir. Pirinin büyük bölümü hücre içerisinde yerleşir, N-terminal ucundaki PYRIN bölgesi (PYD) ekstrasellüler yerleşim gösteren mikrotübüller ile ilişkidir. Ek olarak, ASC aracılığıyla kaspaz-1 aktivasyonuna sebep olur. PYRIN bölgesi ile bZIP bölgesi arasında bulunan iki serin rezidüsü (S208T ve S242R) pirinin inhibisyonunu sağlayan fosforilasyonun yapıldığı bölgelerdir. Coiled-coil (CC) bölgesi PSTPIP-1 ile etkileşir. C-terminal uca ise B30.2/SPRY bölgesi bulunur ve bu bölge direkt olarak kaspaz-1 ile etkileşen bölge olması nedeniyle önemlidir (30,31).



Şekil 2.3. Pirin proteininin yapısal şematizasyonu, etkileşime girdiği moleküller ve etkileri

Pirin, normal şartlarda fosforile edilerek inhibe şekilde tutulur. Fosforilasyon hücre membranına bitişik şekilde bulunan Rho guanozin trifosfatazin (Rho GTPaz) uyardığı protein kinazlar (PKN) aracılığıyla yapılır. Pirin, iki serin bölgesinden

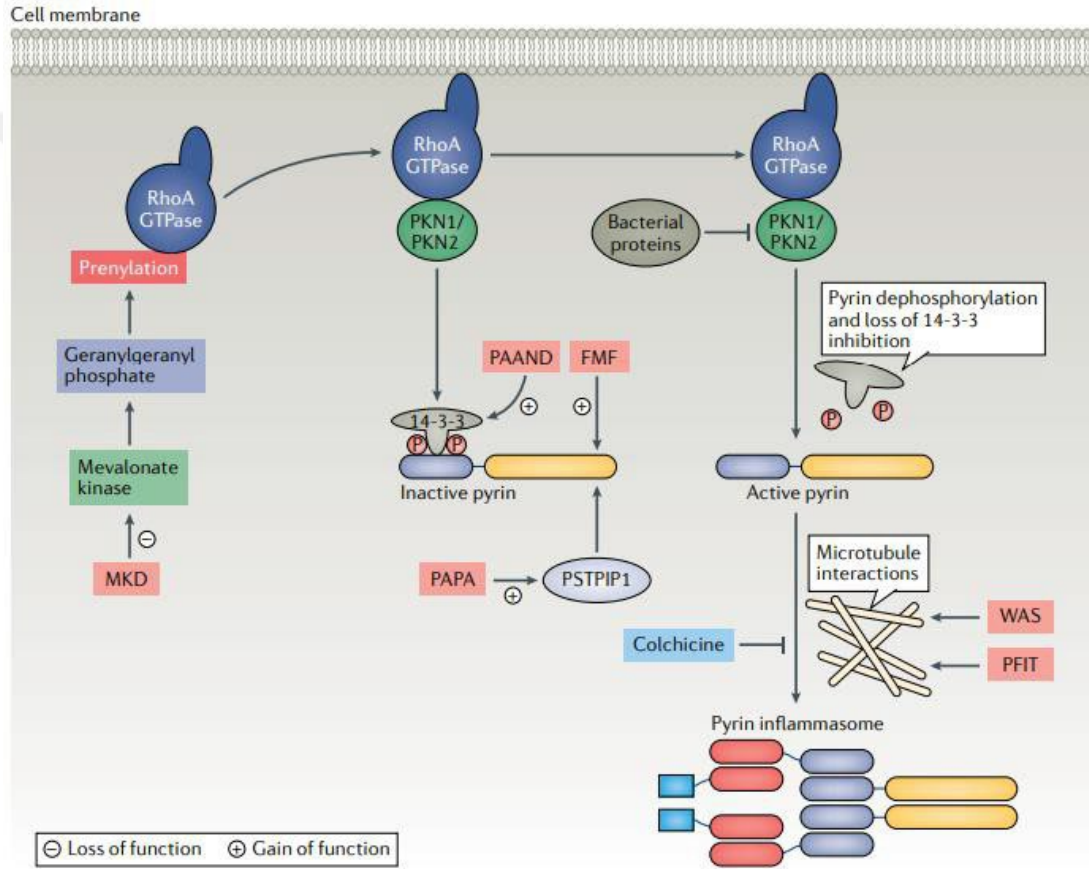
(Ser208 ve Ser242) PKN tarafından fosforile olur, 14-3-3 şaperon proteini pirine bağlanır ve pirini inaktif formda tutar. Burada kullanılan fosfatlar mevalonat kinaz enzimi ile sağlanan geranil-geranil fosfatlardan elde edilir. Pirin, intrasellüler bir PRR olmasına rağmen patojenleri direkt olarak tanıyamaz, Rho GTPaz'da meydana gelen değişiklikleri algılar (32). Bu özellik, diğer PRR'lerde PAMP ve DAMP'ların tanınmasıyla gerçekleşen aktivasyondan farklıdır. RhoGTPaz aktivitesini baskılayan çeşitli patojenlerin varlığında (Toksin A, YopM gibi) protein kinazlar uyarılmaz, pirin defosforile olur ve inhibitör şaperon, pirinden ayrılır. Mikrotübüllerin yardımıyla pirin enflamazomu oluşur (Şekil 2.4) (33). Bu mekanizma, gelişmiş memeli hücrelerindeki reseptör aracılı tanımadan farklıdır ve bitkilerdeki ilkel koruma hipotezine benzerlik göstermektedir (34). Pirin enflamazomu oluştuğunda, enflamazomun efektör molekülü olan kaspaz-1 aktifleşir. Aktifleşen kaspaz-1 bir yandan aktif IL-1B ve IL-18'in salınımını sağlar, diğer yandan GSDMD'yi aktif haline dönüştürür. Gasdermin D hücre membranında delik oluşturur, piroptozise neden olur ve hücre içerisindeki proenflamatuvar sitokinler hücre dışına geçer. Monositlerde gözlenen bu duruma ek, nötrofillerden NET'ler salınır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Pirin enflamazomunun oluşumu

Pirin ilişkili otoenflamatuvar hastalıklar; pirin yolağında disregülasyona yol açan ailevi Akdeniz ateşi, mevalonat kinaz eksikliği (MKD), pirin-ilişkili otoenflamasyon ve nötrofilik dermatoz (PAAND) ve piyojenik artrit-piyoderma gangrenozum-akne hastalığından (PAPA) oluşmaktadır (Şekil 2.5). Pirinde direkt

etkilenim yapan iki hastalık ailevi Akdeniz ateşi ve pirin-ilişkili otoenflamasyon ve nötrofilik dermatozdur. Pirin proteinini kodlayan *MEFV* geninde görülen işlevsel kazanım mutasyonları kısa süreli ateş ve poliserözit atakları ile giden ailevi Akdeniz ateşine yol açar (7). İnhibitör 14-3-3 şaperon proteininin pirin proteinine bağlanmasını önleyen tek gen mutasyonu ise tekrarlayan ateş, nötrofilik dermatoz, artralji/miyalji/miyozite yol açan pirin-ilişkili otoenflamasyon ve nötrofilik dermatozu yol açar (35). Pirin yolağı ile ilişkili hastalıklarda IL-1 karşıtı tedaviler, kolşisin, steroid, TNF karşıtı ve IL-18 karşıtı tedaviler öne çıkmaktadır (5).



(Savic S, Caseley EA, McDermott MF. (2020). Moving towards a systems-based classification of innate immune-mediated diseases)

Şekil 2.5. Pirin İlişkili Otoenflamatuvar Hastalıklar

2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi

2.4.1. Tanımlama ve Genel Bilgiler

Ailevi Akdeniz ateşi ilk tanımlanan otoenflamatuvar hastalıktır. Aynı zamanda tüm dünyada en sık görülen monogenik periyodik ateş sendromu ve otoenflamatuvar hastalıktır (36). Pirin proteinini kodlayan *MEFV* genindeki mutasyonlarla oluşan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (37,38). Klasik otozomal resesif geçişli hastalıkların aksine, heterozigot mutasyonlar da hastalığa sebep olur. Hastalık ilişkili mutasyonlar işlevsel kazanım mutasyonudur (7).

MEditerranean FeVer geni, 1997’de iki farklı grup tarafından 16. kromozomda pozisyonel klonlama ile keşfedilmiştir (37,38). Ardından, bu genin ürünü olan 781 aminoasitlik protein olan pirin bulunmuştur (30). Otoenflamatuvar sendrom tanımı ise ancak 1999’da tümör nekrotize edici faktör reseptörü-ilişkili periyodik sendromdan (TRAPS) sorumlu genin bulunması ile öne sürülmüştür (39). İnflamazom kaspaz-aktifleyici kompleks olarak 2002 yılında bulunmuş ve bu hastalıkların moleküler mekanizmaları aydınlatılmaya başlanmıştır (14). Pirin enflamazomu ise yakın dönemde tanımlanmıştır (40). *MEditerranean FeVer* geni, pirin enflamazomu ve moleküler ilişkilerin bulunması ailevi Akdeniz ateşinin daha iyi anlaşılmasını ve yeni tedaviler üzerinde çalışmayı sağlamıştır.

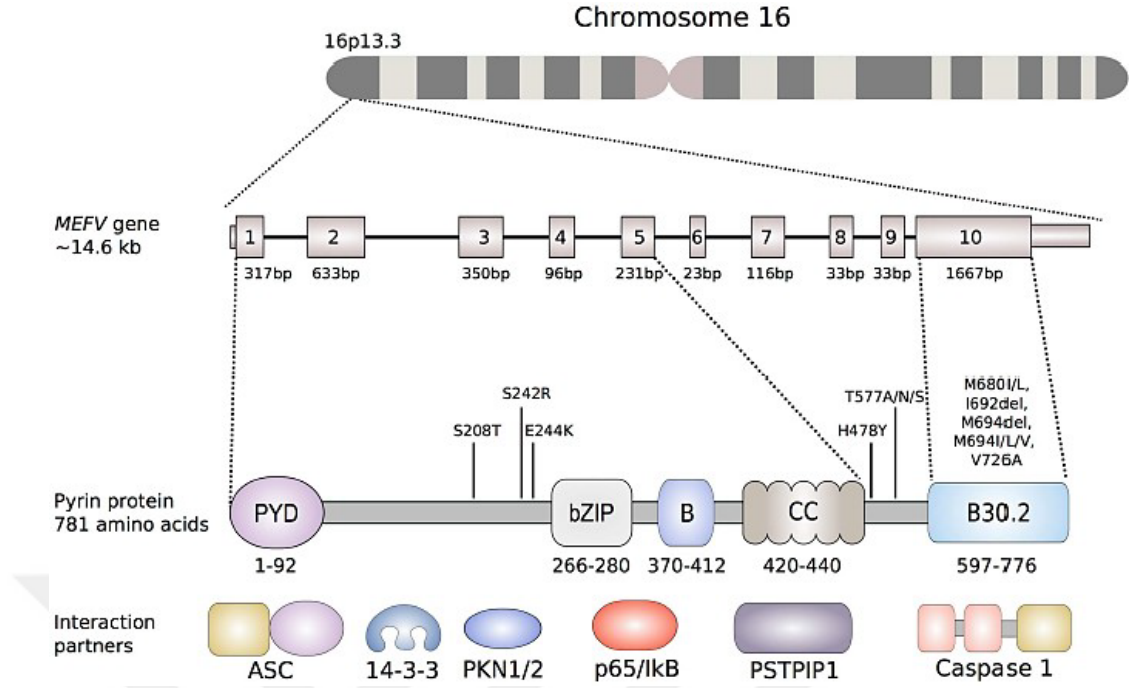
Ailevi Akdeniz ateşi tüm dünyada görülebilmesine rağmen, Doğu Akdeniz kökenli toplumlarda yüksek sıklıkta görülür. Hastalığın sık görüldüğü ve *MEFV* geni taşıyıcılığının da yüksek olduğu toplumlar Türkler, Yahudiler, Ermeniler ve Araplar’dır (41). Türk toplumunda hastalık prevalansı %0,1, taşıyıcılık prevalansı ise %10-15 bildirilmiş olup ailevi Akdeniz ateşinin en sık görüldüğü toplum olma özelliğini taşımaktadır (42,43).

Ailevi Akdeniz ateşi; kısa süreli ateş (6-72 saat), serözit (peritonit, plörit, perikardit, sinovit) ve akut faz yanıtında yüksekliğin görüldüğü enflamatuvar ataklar şeklinde bulgu verir. Atak arası dönemlerde hastaların önemli bir bölümü yakınmasızdır. En önemli komplikasyonu sekonder amiloidozdur (44). Ana tedavi, atakları ve sekonder amiloidozu önleyen kolşisindir (45,46). Yetersiz yanıt veren hastalarda IL-1 tedavi karşıtları kullanılmaktadır (47).

2.4.2. Genetik

On altıncı kromozomun kısa kolunda yerleşen, 10 ekzonu bulunan ve pirin proteinini kodlayan *MEFV* geninde gerçekleşen işlevsel kazanım mutasyonları ailevi Akdeniz ateşine yol açar (37,38). Günümüze kadar hastalıkla ilişkili, çoğunluğunu missens mutasyonların oluşturduğu, 400 civarında varyant veritabanına kaydedilmiştir ve genetik polimorfizmler patojenik, olasılıkla patojenik, önemi bilinmeyen, olasılıkla benin ve benin olmak üzere beş gruba ayrılmıştır (48). Hastalık için tanımlayıcı genotip homozigot veya birleşik heterozigot olmak üzere biallelik patojenik mutasyonların veya bir patojenik ve bir önemi bilinmeyen olmak üzere iki mutasyonun birleşik heterozigot olarak bulunmasıdır (49). Temelde otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalık olarak kabul edilmektedir ancak tek mutasyon taşıyıcıları da hastalık özelliklerini gösterdiğinden ve işlevsel kazanım mutasyonu olduğundan hastalığın psödodominan geçtiğini düşündürmektedir.

Pirin proteini nötrofillerde, monositlerde, dendritik hücrelerde ve serozalarda yerleşen fibroblastlarda eksprese edilir. Pirini kodlayan gende gerçekleşen mutasyonlar IL-1B'nın kontrolsüz üretimi ile aşırı enflamatuvar yanıtı sebep olur (50). Pirin proteininin farklı bölgeleri *MEFV* geninin farklı ekzonları tarafından kodlanır (Şekil 2.6). Hastalık ilişkili patojenik mutasyonlar genellikle 10. ekzonda yerleşir. Pirin proteininin kaspaz-1 ile direkt etkileşime giren C-terminal ucundaki B30.2/SPRY bölgesini kodlayan 10. ekzon mutasyonları daha yüksek enflamasyonla giden kliniğe yol açar (40,51). Bunlardan en sık görülenleri 694 ve 680. pozisyondaki metiyonin rezidülerinde farklılık oluşturan *M694V* ve *M680I* mutasyonlarıdır. Bu mutasyonları taşıyan hastalar daha erken yaşta başlayan klinik bulgular ve daha yüksek hastalık aktivitesi gösterir, sekonder amiloidoz riski daha yüksektir (52,53). Ülkemizden yayımlanan hastalık kohortlarında *M694V* mutasyonu hastaların yaklaşık ¾'ünde bulunur. Yine, *M680I*, *V726A* ve *M694I* mutasyonları da sık görülmektedir (52,54). Riskli olmayan etnik kökeni olan toplumlarda 10. ekzon dışında da patojenik mutasyonlar bildirilmiştir (55,56). Ayrıca, riskli olmayan etnik kökenlerde önemi bilinmeyen mutasyon olarak tanımlanan 2. ekzonda glutamik asitin glutaminle yer değiştirdiği *E148Q* mutasyonu ülkemizde hastalık fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (57,58).



(Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL, Aksentijevich I. (2019). The Pyrin Inflammasome in Health and Disease)

Şekil 2.6. MEFV geni ve pirin proteini

Ailevi Akdeniz ateşi tanısı klinik özelliklere dayanır. Genetik inceleme tanıyı desteklemede önemlidir ve hastalık seyrini öngörmeye faydalı olabilir. Tanıda en duyarlı yaklaşım; klinik özellikler, aile öyküsü, etnik köken ve genetik bulguların beraber değerlendirilmesidir.

2.4.3. Patogenez

Ailevi Akdeniz ateşi doğal immün sistemin bir hastalığıdır. Pirin enflamazomunun aktivasyonuna neden olan *MEFV* geninde gerçekleşen işlevsel kazanım mutasyonları sonucu oluşur. Pirin enflamazomunun aktivasyon eşiği düşer (59). Artmış pirin aktivasyonu; ateş, nötrofillerin serozal dokulara yoğun göçü ve akut faz reaktanlarını içeren çeşitli enflamatuvar proteinlerin karaciğerden sentezinde artışa sebep olur. İnterlökin-1 ana proenflamatuvar sitokindir (7). Hastalıkta 6-72 saat kadar kısa süren enflamatuvar ataklarla karakterize bir hiperenflamatuvar durum görülür. Ataklar kendi kendini sınırlar. Bu bakımdan süreğen enflamasyon gösteren veya uzun süreli enflamatuvar atakların görüldüğü diğer otoenflamatuvar hastalıklardan ayrılır

(60). Ayrıca, pirin enflamazomunun yanıtında gen-doz etkisi görülür, biallelik ekzon 10 mutasyonlarında tek ekzon 10 mutasyonlarına göre pirin enflamazom yanıtı daha yüksektir (7,59).

Pirin enflamazomunu düzenleyen üç protein vardır: RhoGTPaz, 14-3-3 proteini ve protein kinazlar (3,32). Çeşitli bakteriyel toksinler ve moleküller RhoGTPazı inhibe ederek pirin enflamazomu oluşumuna neden olur. Pirin proteini bir PRR olmasına rağmen patojenleri direkt olarak tanıyamaz ve RhoGTPazı inhibe eden patojenik modifikasyonları algılar (32). Bu yanıt pirinin iki serin rezidüsünün (Ser208 ve Ser 242) defosforilasyonu ve 14-3-3 inhibitör proteininin ayrılmasına bağlıdır (61,62).

Pirin proteini normal koşullarda RhoGTPaz-bağımlı protein kinazlar aracılığıyla gerçekleşen fosforilasyonla ve bu bölgelere 14-3-3 proteinleri bağlı iken inhibe durumda bulunur. Ser208/Ser242 bölgelerinden defosforile olan pirin aktifleşir. Mikrotübüller aracılığıyla pirin enflamazomu oluşur ve pro-kaspaz-1 kaspaz-1'e dönüşür. Kaspaz-1 ile pro-IL-1 β ve pro-IL-18 aktif duruma geçer (33).

Ailevi Akdeniz ateşinde S100A8/A9 kompleks ve S100A12 düzeyleri diğer monogenik otoenflamatuvar hastalıklara, poligenik otoenflamatuvar hastalıklara, vaskülitlere ve ağır febril enfeksiyonlara göre belirgin artmış bulunmuştur. Alarminler olarak adlandırılan bu proteinler, nötrofil ve monositlerden salınır ve toll-like reseptör 4 (TLR-4) aracılığıyla proenflamatuvar sitokin salınımını uyarırlar. Hasar-ilişkili moleküler patern olarak görev görür ve enflamazom oluşumunu artırır. Ayrıca, vasküler endotelde proenflamatuvar aktivasyon, lökositlerde yuvarlanma ve hücre dışına kaçışa neden olurlar. Böylelikle dokuda enflamasyon artar (63). Kaspaz-1, GSDMD'nin inhibitör parçasından ayrılmasına yol açarak aktivasyonuna ve hücre membranında delik açmasına sebep olur. S100 proteinlerinin salınımında da pirin, GSDMD ve kaspaz-1 önemlidir. Ayrıca, pirin enflamazomunun oluşumunda önemli olan mikrotübüller S100A8/A9 salınımında da elzemdir (11). Hücre içerisinde üretilen proenflamatuvar sitokinler hücre dışına çıkar, diğer yandan hücresel şişme ve piroptosis gerçekleşir (64). Nötrofillerden kromatin fiberler olan nötrofil ekstrasellüler tuzaklar (NETosis) hücre dışına salınarak enflamasyonu artırır (65). Ailevi Akdeniz ateşi mutasyonu taşıyan hücrelerde bazal otofaji eşiği düşüktür, bu nedenle NET

ilişkili IL-1B salınımına daha yatkındırlar. Mutant pirin otolizozomda yıkıma dirençli olduğundan NET aracılı daha fazla IL-1B üretilir (12). Atak arası dönemde NET oluşumuna direnç görülmektedir, bunun sık atakları önlemek amaçlı gelişen bir homeostatik adaptasyon mekanizması olduğu düşünülmektedir (66).

Ailevi Akdeniz ateşi ataklarının 72 saati geçmemesi önemli bir özelliktir. Bunun sebepleri net olmamakla beraber birkaç mekanizma göze çarpmaktadır. Hastalık patogenezinde en önemli hücrelerden olan nötrofillerin yarılanma ömrü kısadır. Dolaşımında yaklaşık 6-8 saat bulunup dokulara geçtiklerinde 1-2 gün içerisinde ölürlar (67). Nötrofillerden salınan NET'ler negatif geri-bildirim ile oluşumlarını sınırlandırır (65). İstenmeyen hücresel maddelerden kurtulmayı sağlayan bir hücresel yıkım yöntemi olan otofaji devreye girer. İnflamazomlar otofaji aracılığıyla yıkıma uğrar (12,68). İnterlökin-1B ve IL-18'in kompetitif inhibitörleri olan IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) ve IL-18 bağlayıcı protein, reseptörlere IL-1B ve IL-18 bağlanmasını engeller (69,70). Ailevi Akdeniz ateşinde IL-1Ra düzeylerinde azalma olduğu gösterilmiş ve bunun antienflamatuvar kapasitede bozulmaya yol açarak hastalığın patogenezinde önemli olduğu düşünülmüştür (71).

Doğu Akdeniz toplumlarında *MEFV* gen taşıyıcılığının yüksek olması enfeksiyonlara karşı seçici bir koruyuculuk olabileceğini düşündürmüştür. RhoGTPazı baskılayan çeşitli patojenlere karşı pirin enflamazomunun aşırı yanıtının patojenlerle savaşta bu bireylere avantaj sağlayabileceği üzerine çalışmalar yapılmıştır (32,33,72,73). Bu çalışmalarda tüberküloza karşı bir koruma gösterilememiştir (74). Yakın zamanlı yapılan bir çalışmada mutant pirinin *Yersinia Pestis*'in önemli virülans faktörü olan YopM ile daha zayıf bağlandığı, böylelikle vücut savunmasında zayıflama olmadan artmış IL-1B yanıtı oluştuğu ve sağkalımın arttığı bulunmuştur (61).

Kolşisin mikrotübül inhibisyonu yaparak enflamazom oluşumunu önler. Ayrıca RhoGTPazı aktive ederek pirinin inaktif halde kalmasını destekler. Yan etkilerinin genellikle geri dönüşümlü ve hafif olması, hastalık ataklarını ve sekonder amiloidozu önlemesi nedenleriyle günümüzde altın standart tedavidir (31,46). Kolşisine yetersiz yanıt veren veya tolere edemeyen hastalarda IL-1 reseptör antagonistleri veya IL-1B monoklonal antikoru kullanılmaktadır (53).

2.4.1. Klinik, Laboratuvar Bulguları ve Tam Ölçütleri

Ailevi Akdeniz ateşi sıklığı belirsiz yineleyen ateş, karın ağrısı, göğüs ağrısı ve artritis ataklarıyla bulgu verir (52). Egzersiz, stres, enfeksiyon, menstrüel siklus gibi nedenler atağı tetikleyebilir (75). Klinik bulgular %90'ın üzerinde çocukluk çağında ortaya çıkar (76). Erken yaşta başlayan ataklar (2-3 yaş ve öncesi), daha şiddetli hastalık seyri ile ilişkilendirilmiştir. Bu yaş grubunda atağın tek bulgusu ateş olabilir (77). Ataklar 0,5-3 gün arasında sürer ve hastalar genellikle atak arası dönemde yakınmasızdır. Bazı hastalarda atak arası dönemde akut faz yanıtında yükseklik (C-reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), serum amiloid A (SAA), serum fibrinojen) görülebilir, subklinik enflamasyon olarak adlandırılır. Hastalık aktivitesinin kontrol altında olmadığının göstergesidir (78).

Akut peritonit kaynaklı gelişen karın ağrısı apandisit ile karışabilir. Plörit nedeni görülen göğüs ağrısı genellikle tek taraflıdır. Perikardit hastaların ancak az bir kısmında görülür. Artrit genellikle büyük eklemi tutan monoartrit, sekel bırakmaz (52). Hastalık için patognomonik olan erizipel benzeri eritem hastaların az bir kısmında görülür, genellikle atak arası dönemde ortaya çıkar ve artrite eşlik edebilir (79). Bunlar dışında hastalarda nadiren akut skrotum, baş ağrısı ve aseptik menenjit bildirilmiştir. Uzun süreli febril miyalji; beş günü geçen ateş, miyalji ve belirgin akut faz yanıt yüksekliğini tanımlar. Genellikle *M694V* mutasyonu ile ilişkilidir (80). Süreğen enflamasyon; kronik hastalık anemisi, splenomegali ve büyüme geriliğine sebep olabilir (81).

Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında veya *MEFV* taşıyıcılarında ilişkili hastalıklar görülebilir, bunlardan en sık görülenleri kronik artritler, vaskülitler ve enflamatuvar barsak hastalığıdır (82,83).

Sekonder amiloidoz hastalığın en önemli komplikasyonudur. Tekrarlayan sık ataklar ve süreğen enflamasyon AA amiloidin dokularda birikimine neden olur. Klinik bulgular genellikle renal etkilenime bağlı görülür ve nefrotik sendromdan son dönem böbrek yetmezliğine kadar değişkenlik gösterir. Günümüzde erken başlanan tedaviler ve iyi kontrol edilen hastalık aktivitesi, özellikle pediatrik yaş grubunda, amiloidoz insidansını azaltmıştır (84). Renal amiloidoz için en önemli risk faktörleri; yaşanan ülke, homozigot *M694V* mutasyonu, ailede amiloidoz olması ve hastalık süresidir (85).

Farklı klinik bulgulara sebep olabilen ailevi Akdeniz ateşinin ayırıcı tanısında; enfeksiyonlar, immün yetmezlikler, maliniteler, diğer periyodik ateş sendromları, vaskülitler ve diğer sistemik romatolojik hastalıklar bulunur. Bu hastalıklardan ayırt edebilmek ve doğru tanıyı koyabilmek için çeşitli tanı ölçütleri geliştirilmiştir. Hastalık tanısı klinik özelliklere dayanır ve genetik testle desteklenir. Günümüzde çocuklarda iki tanı ölçüt seti kullanılmaktadır. Türk pediatrik ailevi Akdeniz ateşi tanı ölçütlerine göre; üç veya daha fazla sıklıkta 0,5-3 gün süren ateş ($>38^{\circ}\text{C}$), karın ağrısı, göğüs ağrısı, artrit ve ailede ailevi Akdeniz ateşi olan birey varlığından en az ikisinin varlığı tanıyı düşündürür (86). 2019'da yayımlanan Eurofever/PRINTO otoenflamatuvar hastalıklar sınıflama ölçütleri genetik inceleme yapılmış ve yapılmamış olarak iki ölçüt setine ayrılmıştır ve dışlama ölçütleri ile diğer otoenflamatuvar hastalıklardan ayırımında yardımcı olması hedeflenmiştir. Klinik ölçütlerinde, Türk pediatrik tanı ölçütlerine benzer şekilde, 1-3 gün süren ataklar, karın ağrısı, göğüs ağrısı ve artrit bulunmaktadır. Genetik inceleme yapılmamışsa Doğu Akdeniz kökenli olmak bu ölçütlere dahil edilmiştir. Doğrulayıcı *MEFV* genotipi patojenik veya olası patojenik varyantların homozigot veya birleşik heterozigot olması şeklinde tanımlanmıştır (87).

2.5. Çalışmanın Hipotezi ve Amacı

Literatürde GSDMD aracılı piroptozis ve ailevi Akdeniz ateşi ataklarının oluşumundaki rollerine dair yeterli bilgi mevcut değildir. Ailevi Akdeniz ateşinde atak ve atak arası dönemde GSDMD düzeylerindeki değişiklik ve IL-1B ve IL-18 düzeyleri ile ilişki bilinmemektedir. Ataklarda beklenen artış miktarının homozigot ve heterozigot mutasyonlar arasındaki farklılığına dair bilgi mevcut değildir. Literatürdeki bu yetersizlikten yola çıkarak çalışmanın hipotezleri aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

Hipotez 1: Ailevi Akdeniz ateşi atağında gasdermin-D aracılı piroptozis aktif hale geçer.

Hipotez 2: Ailevi Akdeniz ateşinde otoenflamasyonda etkin olan moleküller homozigot mutasyon taşıyanlarda heterozigot mutasyon taşıyanlara kıyasla daha fazla artış gösterir.

Çalışmanın amaçları;

Amaç 1: Ailevi Akdeniz ateşi atağında GSDMD, IL-1B ve IL-18'in arttığını göstermek,

Amaç 2: Ailevi Akdeniz ateşinde atak ve ataklar arası dönemde GSDMD, IL-1B ve IL-18 düzeylerindeki değişiklikleri belirlemek,

Amaç 3: Ailevi Akdeniz ateşi ataklarında homozigot ve heterozigot mutasyon taşıyan hastalar arasında GSDMD, IL-1B ve IL-18 düzeylerindeki artış miktarlarını kıyaslamak,

Amaç 4: Ailevi Akdeniz ateşinde hastalık atağında meydana gelen moleküler mekanizmalara dair bilgiyi artırmak olarak planlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Popülasyonu

Çalışmaya ailevi Akdeniz ateşi tanıli hastalar atak ve atak arası dönemde, sağlıklı çocuklar ve kronik hastalığı olmayıp akut enfeksiyon ile başvuran hastalar dahil edildi. Ailevi Akdeniz ateşi tanısında Türk pediatrik tanı ölçütleri kullanıldı (86). Ailevi Akdeniz ateşi tanısıyla takipli olup hastalık atağı ile başvuran veya atak yakınmaları ile başvurup ailevi Akdeniz ateşi tanısı alan hastalar *çalışma grubu* olarak; sağlıklı çocuklar *kontrol grubu* olarak; bilinen kronik bir hastalığı olmayıp akut enfeksiyona bağlı ateş yakınmasıyla başvuran hastalar *ateşli kontrol grubu* olarak çalışmaya dahil edildi. Çalışma grubundaki hastalar atak ve atak arası dönem olmak üzere iki vizitte görüldü. Enfeksiyon veya enflamasyona yol açabilecek başka bir hastalığı olan veya IL-1 karşıtı tedavi gibi biyolojik tedavi alan hastalar dışlandı. Kontrol grupları yaş ve cinsiyet dağılımları çalışma grubuna benzer çocuklardan seçildi. Ateşli kontrol grubunda bakteriyel ve viral enfeksiyon ayrımı klinik bulgular ve mikrobiyolojik incelemelere göre yapıldı. Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılara çalışma ile ilgili gerekli bilgiler verilerek aydınlatılmış onam alındı.

Etik açıdan onay Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (GO 21/1062, değerlendirme tarihi: 05.10.2021) alınmıştır.

3.2. Yöntemler

Çalışma ileri dönük olarak tasarlanmış bir vaka-kontrol çalışmasıdır. Ailevi Akdeniz ateşi tanıli hastalardan kan numuneleri atak ve atak arası dönemde olmak üzere iki kez alındı. Atak yakınmaları ile başvuran ailevi Akdeniz ateşi hastalarında ve ateşli kontrol grubunda yakınmaların başlamasından en az 8 saat geçtikten sonra kan numuneleri alındı. Çalışma grubu Çocuk Romatoloji Polikliniği'ne başvuran hastalardan, kontrol grupları Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniği'ne başvurmuş olup çalışma için Çocuk Romatoloji Polikliniği'ne yönlendirilen çocuklardan oluştu.

Çalışmaya dahil edilen katılımcıların demografik ve klinik özellikleri ve hastane vizitlerinde rutin olarak alınan laboratuvar değerleri elektronik veri toplama

formuna kaydedildi. Çalışma grubu için ailevi Akdeniz ateşi hastalık başlangıç yaşı, hastalık bulguları, anne-baba arasında akraba evliliği, ailede ailevi Akdeniz ateşi ve amiloidoz varlığı ve kullanılan tedaviler kaydedildi. Kilo ve boy standart sapma skorları (SSS) Türk çocukları normallerine göre hesaplandı (88).

Alınan kan numunelerinden RNA izolasyon kiti ile RNA izole edilerek gerçek zamanlı kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile GSDMD ifade seviyeleri ölçüldü. Serum örneklerinden enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ile IL-1B ve IL-18 düzeyleri ölçüldü. Alınan örnekler önce +4°C, ardından -20°C ve ardından -80°C’de saklandı. Deneysel çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

3.2.1. Gasdermin-D Ekspresyonunun Ölçümü

Gasdermin-D gen ifadesinin ölçümü için RNA izole edilerek RT-PCR ile yapıldı. Çalışma ve kontrol gruplarından PAXgene Blood RNA tüpüne (Qiagen) tüpün vakum ettiği miktarda kan alınarak 2-6 saat oda ısısında inkübe edildikten sonra önce +4°C, ardından -20°C, en son -80°C’ye alınarak donduruldu. Çalışmaya başlamadan önce numuneler en az 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

RNA izolasyon basamakları aşağıda sıralanmıştır:

1. PAXgene Blood RNA tüpü rotor kullanılarak on dakika boyunca 20°C’de 4000*g hızında santrifüj edildi.
2. Süpernatant dekantasyon yoluyla ayrıldı. Tüp içerisindeki pelet üzerine dört mL RNaz içermeyen su eklendi ve yeni bir kapak ile kapağı kapatıldı.
3. Pelet görünür şekilde çözününceye kadar vortekslendi ve on dakika boyunca 4000*g hızında santrifüj edildi. Ardından süpernatantın tamamı atıldı.
4. Üç yüz elli µL resüspansiyon tamponu eklendi. Pelet görünür şekilde çözünene dek vortekslendi.
5. Tüp içerisindeki örnek mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 300 µL bağlama tamponu ve 40 µL proteinaz K eklendi. Beş saniye vortekslenerek karıştırıldı ve çalkalayıcı inkübatör kullanılarak on dakika boyunca 55°C’de 1000 rpm hızında inkübe edildi.

6. Lizat iki mL'lik işleme tüpüne yerleştirilmiş PAXgene Shredder döndürme kolonuna pipetlendi. En yüksek hız olan 14000*g hızda üç dakika santrifüj edildi.
7. Aşağı geçen süpernatanın tamamı işleme tüpündeki pelet bozulmadan yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
8. Üç yüz elli µL etanol (%100 saflıkta) eklendi. Vortekslenip karıştırıldı ve tüp kapağının içindeki damlaların giderilmesi amacıyla kısa süreli (1-2 saniye kadar) santrifüjlendi.
9. İşleme tüpüne yerleştirilmiş PAXgene RNA döndürme kolonuna 700 µL örnek eklendi. 14000*g hızında 1 dakika süresince santrifüjlendi. Döndürme kolonu yeni bir işleme tüpüne yerleştirildi ve eski işleme tüpü atıldı.
10. PAXgene RNA döndürme kolonuna kalan örnek pipetle aktarıldı. 14000*g hızında 1 dakika santrifüjlendi. Döndürme kolonu (PRC) yeni bir işleme tüpüne yerleştirildi ve eski işleme tüpü atıldı.
11. Üç yüz elli µL yıkama tamponu PAXgene döndürme kolonuna pipetle eklendi. Bir dakika boyunca 14000*g hızında santrifüj yapıldı. Döndürme kolonu yeni bir işleme tüpüne yerleştirildi. Eski işleme tüpü atıldı.
12. DNaz 1 stok solüsyonu, DNaz resüspanسیون tamponu 550 µL içerisinde katı DNaz I çözülerek hazırlandı. Şişe yavaşça tersine çevrilerek karıştırıldı. Örnek sayısına göre, örnek başına on µL DNaz I stok solüsyonuna 70 µL DNA parçalama tamponu (RDD) eklenerek 2 mL'lik santrifüj tüpüne konuldu. Tüp hafifçe karıştırıldı.
13. 80 µL DNaz I (RNFD) inkübasyon karışımı doğrudan PAXgene RNA döndürme kolonunun (PRC) membranına pipetlendi. On beş dakika süresince oda ısında bekletildi.
14. PAXgene RNA döndürme kolonuna 350 µL yıkama tamponu eklendi. 14000*g hızında 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Döndürme kolonu yeni bir işleme tüpüne yerleştirildi. Eski işleme tüpü atıldı.
15. PAXgene RNA döndürme kolonuna 500 µL yıkama tamponu eklendi. 14000*g hızında bir dakika boyunca santrifüj edildi. Döndürme kolonu yeni bir işleme tüpüne yerleştirildi. Eski işleme tüpü atıldı.

16. PAXgene RNA döndürme kolonuna 500 µL daha yıkama tamponu eklendi. 14000*g hızında üç dakika boyunca santrifüj edildi.
17. Akış kısmını içeren işleme tüpü atıldı. PAXgene RNA döndürme kolonu yeni bir işleme tüpüne yerleştirildi. 14000*g hızında bir dakika boyunca santrifüj edildi.
18. Akış kısmını içeren işleme tüpü atıldı. PAXgene RNA döndürme kolonu (PRC) bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra üzerine 40 µL elüsyon tamponu membrana pipetle eklendi. 14000*g hızında bir dakika boyunca santrifüj edildi.
19. Akış kısmında bulunan 40 µL elüsyon tamponu alınıp PAXgene RNA döndürme kolonu üzerine pipetlendi. Tekrar 14000*g hızında 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
20. RNA konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 spektrofotometresi ile ölçüldü. cDNA aşamasına kadar RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

Ölçülen RNA konsantrasyonlarının ortalaması 173,136 ng/µL bulundu. Ardından cDNA sentez (Quantitech Reverse Transcription Kit, Qiagen) aşamasına geçildi.

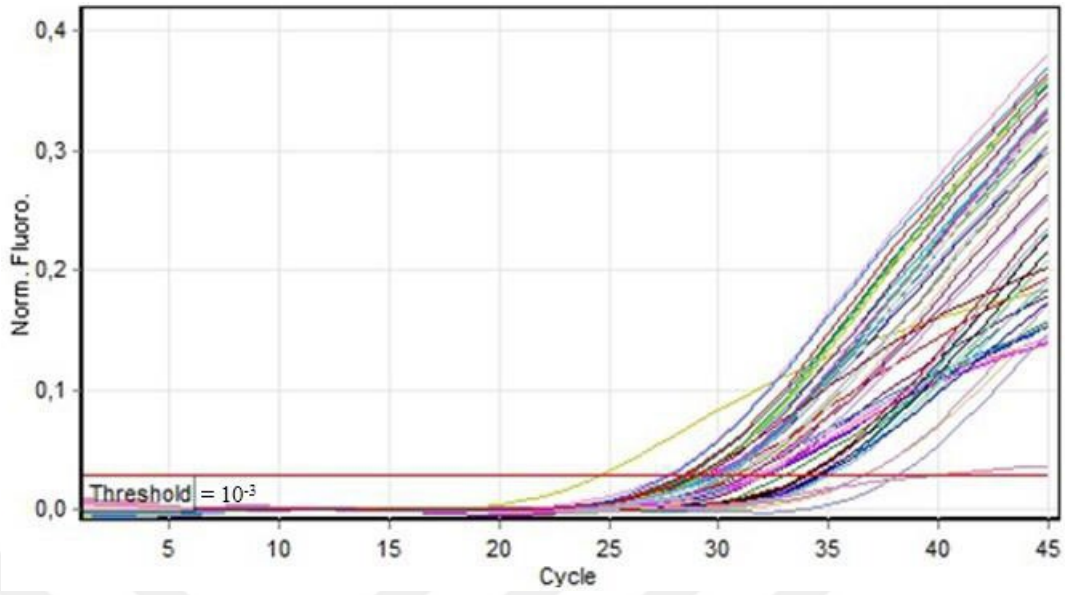
1. RNA örnekleri buz üzerinde çözüldü. gDNA uzaklaştırma tamponu, Quantiscript revers transkriptaz, Quantiscript RT tamponu, RT primer miks oda ısısında çözüldü.
2. Genomik DNA'nın eliminasyonu 0,5 mL'lik PCR tüplerinde her bir reaksiyon için 2 µL gDNA uzaklaştırma tamponu ve toplam reaksiyon hacmi 14 µL olacak şekilde template RNA (10 pg to 1µg) ve RNaz içermeyen su (RNA konsantrasyonuna göre değişkenlik göstermektedir) kullanılarak yapıldı.
3. 42°C'de 2 dakika inkübasyonun ardından 0,5 mL'lik PCR tüpleri buz üzerine alındı.
4. Revers transkripsiyon reaksiyonu aşamasında her bir reaksiyon için 1 µL Quantiscript revers transkriptaz, 4 µL Quantiscript RT tamponu ve 1 µL RT primer miks ile karışım hazırlandı (buz üzerinde).
5. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonunun (2. adım) ardından elde edilen template RNA'ların (14 µL) üzerine hazırlanan master miksten 6'şar µL pipetlendi (buz üzerinde).

6. 42°C’de 15 dakika inkübasyonun ardından Quantiscript revers transkriptaz’ı inhibe etmek için 95°C’de 3 dakika inkübasyon yapıldı.
7. Sentezlenen template cDNA örnekleri buz üzerine alındı.

Ardından RT-PCR (Quantinova Probe PCR Kit, Qiagen) aşamasına geçildi.

1. QuantiNova Probe PCR Master Mix, template cDNA, QuantiNova LNA Probe PCR Assay (Gasdermin D ve *housekeeping* gen olarak GAPDH gen bölgelerine özel primer ve Taqman prob dizileri) ve RNaz içermeyen su kullanılarak RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.
2. RT-PCR reaksiyonu aşamasında her bir reaksiyon için 10 µL QuantiNova Probe PCR Master Mix, 2 µL Probe PCR assay ve 6 µL RNaz içermeyen su ile bir karışım hazırlandı. Hazırlanan miks 0,1 ml’lik RT-PCR tüplerine herbiri 18 µL olacak şekilde pipetlendi ve ardından RT-PCR tüplerine toplam reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde 2 µL cDNA pipetlendi.
3. Tüm pipetlemeler soğuk blok üzerinde yapıldı.
4. Tüm örnekler iki kuyucukta çalışıldı.
5. RT-PCR reaksiyonu Corbett RotorGene cihazında gerçekleştirildi.
6. PCR başlangıç sıcaklık aktivasyonu (95°C, 2 dakika) ve ardından 45 siklus olacak şekilde denatürasyon (95°C, 5 sn) ile kombine annealing/uzatma fazı (60°C, 5 sn) olarak belirlendi.

Daha hassas değerlendirme sağlaması amacıyla eşik değer 10^{-3} olarak kabul edildi. Eşik döngüsü (Ct) ise PCR’da sistemin ürünün miktarındaki artışı floresan miktarındaki artışla fark ettiği ve ürünün eksponensiyel olarak artmaya başladığı zaman olarak belirlendi. Kırk döngünün üzerindeki Ct değeri hesaba katılmadı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. RT-PCR’da verilerin kantifikasyonu

Sağlıklı kontrol grubunun medyanına kıyasla GSDMD’nin medyan kat değişimi, her hasta için GSDMD seviyesinin değerlendirilmesinde kullanıldı. Gen ifade seviyeleri Delta-Delta Ct metodu ile hesaplandı.

3.2.2. İnterlökin-1B ve İnterlökin-18 Düzeylerinin Ölçümü

Çalışma ve kontrol grubundan serum tüpüne kan alındı. On dakika santifüj edildikten sonra jel üzerinde toplanan serum pipetle eppendorf tüplerine aktarıldı ve çalışma gününe kadar donduruldu. Çalışma öncesinde serum örnekleri oda ısısına getirildi ve IL-1B ve IL-18 düzeyleri ölçüldü. IL-1B ve IL-18 miktarı; mekanizma olarak antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesiyle antijen-antikor ilişkisini inceleyen kantitatif bir ölçüm yöntemi olan ELISA yöntemiyle tayin edildi. Alınan ELISA kitinin protokolüne uyuldu (Human Interleukin-1B ELISA kit ve Human Interleukin-18 ELISA kit, BT Lab, England).

Serum örnekleri ve kit solüsyonları kullanım öncesinde oda ısısına getirildi. ELISA plakaları insan antikorları ile kaplanmış olan hazır plakalardı. Standartlar (standart 1-5), standard konsantrasyonu IL-1B için 8000 pg/mL’den, IL-18 için 128 ng/L’den seyreltilerek hazırlandı. Blank solüsyon eklendi. Tüm serum örnekleri, standartlar ve blank solüsyon duplike çalışıldı. Standartların içerisinde (50 µL)

biyotinlenmiş antikor bulunduğundan standartlara biyotinlenmiş antikor eklenmedi. Plakalara önce serum örnekleri (40 µL) pipetlendi. Ardından IL-1B ölçümü için anti-IL-1B antikor (10 µL) ve IL-18 için anti-IL-18 antikor (10 µL) eklendi. Serum örnekleri ve standartlara streptavidin-HRP (50 µL) eklendi, blank solüsyona eklenmedi. Plakalar ELISA *seal* kapatılarak inkübe edildi (37°C, 60 dakika). Plakalar yıkama solüsyonu kullanılarak (20 mL wash buffer ile 500 mL'ye distile su ile tamamlanarak ve kristalize olan karışım tam açılarak) beş kez yıkandı. Plaka üzerinde artakalan yıkama solüsyonu emici kağıt ile uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara önce substrat A (50 µL) ve substrat B (50 µL) eklendikten sonra plaka *seal* ile kapatılarak karanlıkta 37°C'de inkübe edildi. Ardından tüm kuyucuklara durdurma (*stop*) solüsyonu (50 µL) eklendi ve değişken skaladaki mavi rengin yine değişken skaladaki sarı renge dönüştüğü görüldü. On dakika bekledikten sonra mikropate okuyucu ile optik dansite değerleri elde edildi (SPECTROstar Nano, BMG Labtech). Standart solüsyonlara göre korelasyon katsayıları (R^2) IL-1B için 0,9942 ve IL-18 için 0,9917 bulundu.

3.2.3. İstatistiksel Analizler

SPSS 21.0 software kullanılarak oluşturulan veri tabanında istatistiksel incelemeler yapıldı. Görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilks) değişken dağılımları değerlendirildi. Dağılım normalse ortalama ve standart sapma, normal dağılıma uymayanlar için ortanca ve çeyrekler arası aralık (IQR) kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmada normal dağılan değişkenler *Student t testi*, normal dışı dağılımı olanlarda *Mann Whitney U testi* uygulandı. Sayısal veriler arasındaki korelasyonda *Spearman korelasyon testi* uygulandı. Korelasyon katsayısının (r) 0,2-0,4 olması hafif, 0,4-0,6 orta, 0,6'nın üzerinde olması yüksek derecede anlamlılık olarak kabul edildi. İstatistiksel anlamlılık sınırı (p değeri) 0,05'in altı olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarının Demografik, Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Toplamda 16 ailevi Akdeniz ateşi hastası atak ve atak arası dönemde çalışmaya alındı. Hastalar atak bulguları ile başvurduğunda benzer bulgulara yol açabilecek diğer nedenler dışlandı. Ortanca başvuru süresi 18,0 saatti (IQR: 20,5, min-maks: 8,0-48,0). Hastaların %37,5'inde (n: 6) anne ve baba arasında akrabalık bağı vardı. Yüzde 50,0'sinde (n: 8) ailede ailevi Akdeniz ateşi tanısı ve birinde ailede amiloidoz öyküsü vardı. Hastalardan birinde önemi bilinmeyen mutasyon olarak kabul edilen *E148Q*-saptanması üzerine yeni nesil dizileme ile genişletilmiş ateşli hastalıklar paneli çalışıldı ve negatif sonuçlandı. Hastaların ilk başvuru atak dönemindeki klinik, laboratuvar özellikleri ve genetik mutasyonları Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Beş hastanın öncesinde ailevi Akdeniz ateşi tanısı mevcuttu ancak bunlardan ikisi ilaç uyumsuzluğu nedeniyle kolşisin tedavisi kullanmamaktaydı. Diğer üç hastanın ikisinin kolşisin dozu artırıldı. Atak sonrasında ailevi Akdeniz ateşi tanısı konulan altı hastaya kolşisin tedavisi başlandı. Kalan beş hastanın tekrarlayan atakları ve genetik mutasyonları görüldükten sonra kolşisin başlandı. Hastalarda biyolojik ilaç kullanım öyküsü yoktu.

Tablo 4.1. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarının ataktaki klinik ve laboratuvar özellikleri

Klinik ve laboratuvar özellikler	Ortalama $\pm$ SS veya n: 16 (%)
Yaş, yıl	8,02 $\pm$ 3,75
Kız	9 (56,3)
Kilo, SSS	0,21 $\pm$ 0,97
Boy, SSS	0,64 $\pm$ 1,01
AAA ilişkili tekrarlayan klinik bulgular	
Ateş	16 (100)
Karın ağrısı	13 (81,3)
Göğüs ağrısı	4 (25,0)
Artrit	1 (6,3)
Erizipel benzeri eritem	1 (6,3)
Egzersiz ilişkili bacak ağrısı	5 (31,3)
Uzamış febril miyalji	0
Atakta laboratuvar bulguları	
Serum C-reaktif protein, mg/L	47,93 $\pm$ 36,84
Eritrosit sedimentasyon hızı, mm/sa	23,06 $\pm$ 10,29
Serum fibrinojen, mg/dL	4,01 $\pm$ 0,92
Serum amiloid A, mg/dL	48,50 $\pm$ 37,99
Total lökosit sayısı, $\times 10^9/L$	11,70 $\pm$ 4,61
Nötrofil sayısı, $\times 10^9/L$	8,39 $\pm$ 4,29
Hemoglobin konsantrasyonu, g/dL	11,81 $\pm$ 1,11
Trombosit sayısı, $\times 10^9/L$	355,81 $\pm$ 111,05
MEFV genetik inceleme	
Biallelik patojenik mutasyon	8 (50,0)
M694V/M694V	4 (25,0)
M694V/V726A	2 (12,5)
M694V/M680I	1 (6,3)
M680I/M680I	1 (6,3)
Birleşik heterozigot mutasyon	2 (12,5)
M694V/E148Q	1 (6,3)
V726A/E148Q	1 (6,3)
Diğer	6 (37,5)
M694V/-	3 (18,8)
M680I/-	2 (12,5)
E148Q/-	1 (6,3)

AAA: ailevi Akdeniz ateşi, IQR: çeyrekler arası aralık, MEFV: MEiterranean FeVer, SSS: standart sapma skoru

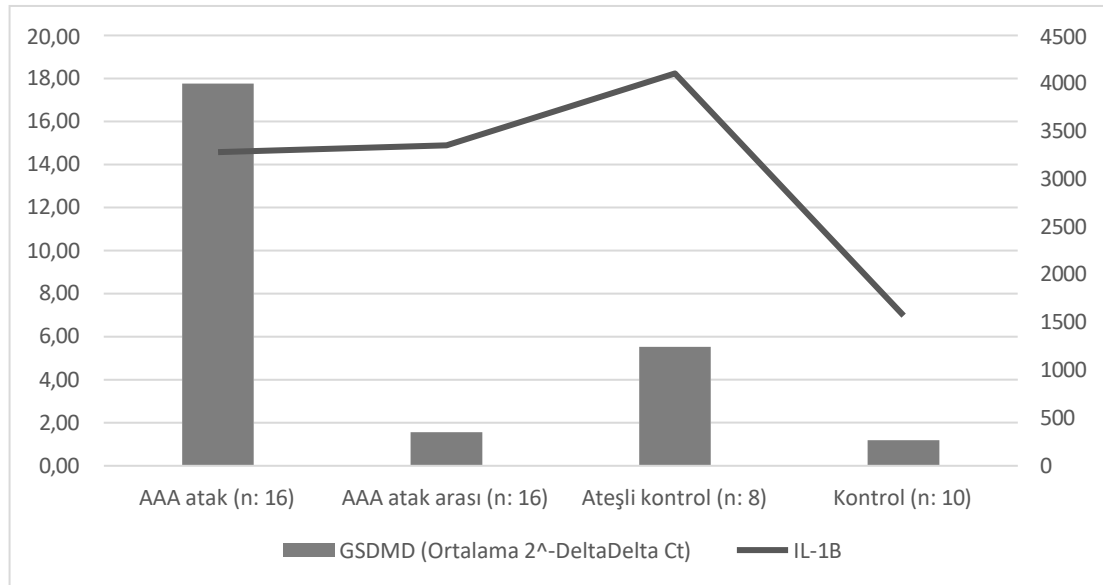
4.2. Kontrol Gruplarının Demografik, Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Sağlıklı kontrol grubu (n: 10) ve ateşli kontrol grubu (n: 8) yaş ve cinsiyet bakımından hasta grubuna benzerdi. Ateşli kontrol grubunda beş hasta üst solunum yolu enfeksiyonu, ikisi akut gastroenterit ve biri alt solunum yolu enfeksiyonu nedenli

ateşlenmişti. Üst solunum yolu enfeksiyonu olan hastalardan ikisi, alt solunum yolu enfeksiyonu olan hasta ve akut gastroenterit olan hastalardan birinde (n: 4) bakteriyel enfeksiyona dair klinik ve laboratuvar bulgular, kalanlarda ise (n: 4) virüsler kaynaklı bulgular mevcuttu. Ortanca başvuru süresi 21,0 saati (IQR: 33,5, min-maks: 12,0-48,0). Ateşli başvurularında alınan akut faz proteinlerinin ortalamaları; CRP $53,94 \pm 17,65$ mg/L, ESH $30,88 \pm 17,37$ mm/sa, serum fibrinojen $3,59 \pm 0,90$ mg/dL ve serum amiloid A $36,22 \pm 32,69$ mg/dL olarak bulundu. Bu değerler ailevi Akdeniz ateşi hastalarının atakta başvurularında bulunan akut faz yanıtlarına benzerdi ($p>0,05$). Bakteri ve virüs ile enfekte olmuş hastalar kıyaslandığında, bakteri kaynaklı enfeksiyonlarda akut faz yanıtları daha yüksekti, ancak istatistiksel anlamlılık olarak benzer bulundu.

4.3. Çalışma Gruplarında Gasdermin-D, IL-1B ve IL-18 Düzeyleri ve Gruplararası Karşılaştırma

Çalışma gruplarında GSDMD ifade seviyeleri ve IL-1B düzeyleri Şekil 4.1’de sunulmuştur. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında atak dönemlerinde GSDMD gen ekspresyonu diğer çalışma gruplarına göre anlamlı yüksekti ($p<0,001$).



Şekil 4.1. Çalışma gruplarında Gasdermin D ifade seviyeleri ve IL-1B düzeyleri

Çalışma grupları arasında CRP, IL-1B, IL-18 düzeyleri ve GSDMD ekspresyonlarının kıyaslanması Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında atak ve atak arası dönemde IL-1B ve IL-18 düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmezken atakta GSDMD gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü.

Ailevi Akdeniz ateşi hastalarının atak başvuruları ve ateşli kontrol grubunda IL-1B ve IL-18 düzeyleri benzerdi. Gasdermin-D gen ekspresyonları arasında da fark yoktu ancak p değeri sınırdaydı ($p=0,050$).

Bakteriyel enfeksiyonu olan hastalarda (n: 4), viral enfeksiyonu olan hastalara göre (n: 4), istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmayan CRP ($70,65 \pm 58,75$ ve $37,22 \pm 40,24$ mg/L), IL-1B (4835 ± 3621 ve 3599 ± 1414 pg/mL) ve IL-18 ($81,61 \pm 59,79$ ve $66,38 \pm 20,40$ ng/L) düzeylerinde artış, GSDMD gen ekspresyonunda ise ($2,93 \pm 2,88$ ve $9,00 \pm 10,87$) azalma tespit edildi (tüm $p>0,05$). Gasdermin-D gen ekspresyonu ile nötrofil ve lenfosit sayıları arasında anlamlı korelasyon saptanmadı.

Ailevi Akdeniz ateşi atağı ve viral enfeksiyonu olan ateşli kontrol grubu kıyaslandığında; GSDMD gen ekspresyonu iki grup arasında benzerdi ($17,75 \pm 20,64$ ve $9,00 \pm 10,87$, $p=0,328$). Bakteriyel enfeksiyonu olan ateşli kontrol grubunda ataktaki ailevi Akdeniz ateşi hastalarına göre düşük bulundu. Bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlıydı ($17,75 \pm 20,64$ ve $2,93 \pm 2,88$, $p=0,013$).

Tablo 4.2. Çalışma gruplarında laboratuvar bulgularının kıyaslanması

	Grup 1: AAA atak	Grup 2: AAA atak arası	Grup 3: Ateşli kontrol	Grup 4: Kontrol	Grup 1-4	Grup 2-4	Grp 3-4	Grup 1-2	Grup 1-3
CRP, mg/L	47,93 ± 36,84	2,85 ± 2,29	48,56 ± 51,36	3,60 ± 1,47	<0,001	0,504	0,025	<0,001	0,769
IL-1B, pg/mL	3280 ± 2618	3352 ± 2618	4102 ± 2818	1570 ± 223	0,020	0,016	0,025	0,939	0,424
IL-18, ng/L	56,37 ± 39,14	56,70 ± 39,19	72,39 ± 45,27	25,59 ± 7,38	0,008	0,008	0,016	0,982	0,341
GSDMD gen ekspresyonu*	17,75 ± 20,63	1,55 ± 2,09	5,53 ± 7,35	1,17 ± 0,67	0,006	0,500	0,168	0,007	0,050

*2^{-DeltaDeltaCt}

4.4. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Genotip, Laboratuvar Bulguları ve Kolşisin Tedavisi ile Gasdermin-D, IL-1B ve IL-18 Düzeylerinin İlişkisi

Mediterranean FeVer geninde biallelik (n: 8) ve tek allelde (n: 7) ekzon 10 mutasyonu taşıyan hastalar kıyaslandığında; hastalık atağında GSDMD gen ekspresyonu, IL1B ve IL18 düzeylerinde anlamlı fark bulunmadı ($p=0,656$, $p=0,555$, $p=0,483$). Bu iki grup arasında atakta akut faz protein yükseklikleri açısından da (serum CRP, ESH, SAA, serum fibrinojen) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kırmızı hücre dağılım aralığı (RDW) biallelik ekzon 10 mutasyonu taşıyan hastalarda tek allelde taşıyan hastalara göre anlamlı daha yüksekti ($15,56 \pm 1,97$ - $13,83 \pm 0,64$, $p=0,044$), diğer kan sayımı parametreleri ise iki grup arasında benzerdi.

Atakta başvuran hastaların (n: 16) total lökosit sayısı, akut faz proteinleri, IL-1B, IL-18 ve GSDMD gen ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon incelemeleri Tablo 4.3'te sunulmuştur. Serum IL-1B ve IL18 düzeylerinde aynı yönlü yüksek anlamlı korelasyon saptandı ($r: 0,935$, $p<0,001$), bu sitokinler ile GSDMD gen ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon gözlenmedi. Atak şikayetleri başladıktan sonra geçen süreye göre akut faz proteinleri (CRP, ESH, SAA, fibrinojen), IL-1B, IL-18 ve GSDMD gen ekspresyon düzeyleri benzerdi.

Tablo 4.3. Atak ile başvuran ailevi Akdeniz ateşi hastalarında laboratuvar parametreleri arasındaki korelasyon#

	IL-1B	IL-18	GSDMD gen ekspresyonu*
Total lökosit sayısı, $\times 10^9/L$	0,085	0,119	0,264
Serum C-reaktif protein, mg/L	0,143	0,171	0,540^{^^}
Eritrosit sedimentasyon hızı, mm/sa	0,151	0,164	0,332[^]
Serum fibrinojen, mg/dL	-0,102	-0,098	0,504^{^^}
Serum amiloid A, mg/dL	0,049	0,094	0,570^{^^}

#Spearman korelasyon testi (r ; [^] $p<0,05$; ^{^^} $p<0,01$); * $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Kolşisin tedavisi alan ve henüz kolşisin başlanmayan hastalarda atak ve atak arası vizitte bakılan laboratuvar parametreleri Tablo 4.4'te görülmektedir. Hastaların tümüne 2.vizitte kolşisin başlanmıştır. Tüm vizitler değerlendirildiğinde kolşisin kullanan hastalarda IL-1B ve IL-18'de anlamlı azalma (her iki $p=0,006$) olduğu, GSDMD ekspresyonunun değişmediği saptandı ($p=0,210$).

Tablo 4.4. Kolşisin tedavisi kullanan ve henüz başlanmayan hastalarda IL-1B, IL-18 ve Gasdermin-D düzeyleri

	Atak viziti			Atak arası vizit		
	Kolşisin (+) (n: 3)	Kolşisin (-) (n: 13)	<i>p</i> <i>değeri</i>	Kolşisin (+) (n: 11)	Kolşisin (-) (n: 5)	<i>p</i> <i>değeri</i>
IL-1B, pg/ml	1774 ± 517	3627 ± 2798	0,043	2100 ± 646	6107 ± 3296	0,052
IL-18, ng/l	33,62 ± 8,89	61,63 ± 41,74	0,044	38,17 ± 10,00	97,46 ± 49,88	0,056
GSDMD gen ekspresyonu*	21,43 ± 28,78	16,90 ± 19,75	0,816	1,21 ± 1,83	2,30 ± 2,63	0,439

*Ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$

5. TARTIŞMA

Ailevi Akdeniz ateşi en eski ve en iyi bilinen otoenflamatuvar hastalık olmasına rağmen patogenetik özellikleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Patogenezinde GSDMD, IL-1B ve IL-18'in önemli rolünün olduğu bilinmektedir, ancak bu moleküllerin oluşumu, etkisi ve etki derecesine dair bilgiler kısıtlıdır. Bu çalışmada, GSDMD, IL-1B ve IL-18'in ailevi Akdeniz ateşi genetik, klinik ve laboratuvar bulguları ile ilişkisi incelenmiş, ayrıca sağlıklı çocuklar ve akut ateşli hastalığa sahip çocuklarla kıyaslanmıştır.

Ailevi Akdeniz ateşinde sorumlu gen olan *MEFV* geninin kodladığı pirin proteini mutasyona uğradığında inhibitör proteinlerle stabil olmayan bağlar kurar, uyarılma eşiği düşer ve sonuç olarak pirin enflamazomunun oluşumu kolaylaşır (59,89). Pirin enflamazomunun oluşumu ile kaspaz enzim sistemi aktif hale gelir ve son ürünleri olan aktif IL-1B, IL-18 ve GSDMD oluşur. Gasdermin-D'nin hücre membranında açtığı delikler sebebiyle piroptosis gelişir, hücre içi sitokinler dışarı çıkar ve enflamasyon kaskad halinde ilerler (9). Böylelikle, görünürde spontan olarak gelişmiş aşırı enflamasyonun klinikteki yansıması olan hastalık atakları görülür. Bu çalışmada, ailevi Akdeniz ateşi hastalarının atak dönemlerinde IL-1B, IL-18 düzeyleri ve GSDMD gen ekspresyonunun sağlıklı çocuklara göre arttığı, atak arası dönemde ise GSDMD gen ekspresyonu sağlıklı çocuklarla benzer düzeylere inerken IL-1B ve IL-18'in halen yüksek kaldığı gösterildi. Atak ve atak arası dönemde IL-1B ve IL-18 düzeyleri arasında fark bulunmadı. Önceki çalışmalarda ailevi Akdeniz ateşi hastalarında atak arası dönemde IL-1B'nin yüksek olduğu, bunun subklinik enflamasyonun bir göstergesi olabileceği düşünülmüştür (90). Nitekim, çalışmamızda kolşisin kullanımı ile beraber GSDMD ekspresyonunda tedavi ilişkili fark yokken IL-1B ve IL-18 düzeylerinin baskılandığı görüldü. Başka bir çalışmada, ailevi Akdeniz ateşi hastalarında ataklarda ve atak arası dönemde interlökin-1B'nin benzer yükseklikte olduğu gösterilmiştir (91). Bu bulgular *M694V* mutasyonu taşıyan hastaların nötrofillerinden in vitro olarak IL-1B, IL-18, S100A12 ve kaspaz-1 salınımının arttığının gösterilmesiyle desteklenmiştir (92). Fare modellerinde de ailevi Akdeniz ateşinin temel olarak IL-1B aracılı bir hastalık olduğu, IL-1B'nin belirgin artışı ile gösterilmiştir (93,94). Bu sonuçlar, ailevi Akdeniz ateşi hastalarında IL-1B

ve IL-18'in kronik enflamasyonun önemli bir bulgusu olduğunu, enflamasyonu baskılamada ise kolşisinin etkili olduğunu düşündürmüştür. Çalışmada elde edilen bulgular ve literatür bilgileri, atakta GSDMD'nin önemini, atak arası dönemde ise GSDMD gen ekspresyonundan bağımsız olarak IL-1B ve IL-18'in yüksek kalabildiğini göstermektedir. Gasdermin D ile IL-1B ve IL-18 düzeyleri arasında korelasyonun olmaması da bu bulguyu desteklemektedir.

Gasdermin-D piroptozise yol açan en kritik moleküldür ve akut enfeksiyonlar ve pekçok kronik hastalık ile ilişkilendirilmiştir (9). Ailevi Akdeniz ateşinde enflamasyonun oluşumunda elzemdir (95). Gasdermin D'nin silindiği ailevi Akdeniz ateşi fare modellerinde klinik ve laboratuvar olarak enflamasyonun gelişmediği gösterilmiştir (11,95). Bu çalışmada atakta, atak arası döneme kıyasla, GSDMD ifadesinde on kattan fazla artış olduğu gösterildi. Ayrıca atakta GSDMD gen ekspresyonu ile akut faz reaktanları arasında oldukça anlamlı derecede korelasyon bulundu. Bu bulgular ailevi Akdeniz ateşinde akut enflamatuvar ataklarda GSDMD'nin primer bir rolü olduğunu desteklemektedir. Kolşisin tedavisi kullanan ve henüz tedavisi başlanmayan hastalarda kolşisinin GSDMD ekspresyonu üzerinde belirgin etkisinin olmadığı görüldü. Bu durum vaka sayısının azlığından kaynaklanabilir. Daha fazla hasta ile çalışma yapılması tedavi cevabının değerlendirilmesinde faydalı olacaktır.

Gasdermin-D'nin ve ilişkili piroptozisin bakteriyel enfeksiyonlardaki önemi bilinmekle beraber virüs enfeksiyonlarındaki değişimine dair veriler henüz kısıtlıdır (96). Nitekim, çalışmamızda da bakteriyel enfeksiyonu olan ateşli çocuk hastalarda sağlıklı çocuklara göre GSDMD gen ekspresyonu iki kat kadar artmış bulundu. Ancak ilginçtir ki, viral enfeksiyonu olan çocuklarda bakteriyel enfeksiyonlara kıyasla IL-1B ve IL-18 proenflamatuvar sitokinleri daha düşükken GSDMD gen ifadesi dört kat kadar artmış olarak saptandı. Ailevi Akdeniz ateşi atak değerleri ile kıyaslandığında bakteriyel enfeksiyonu olan çocukların GSDMD gen ekspresyonları anlamlı düşükken viral enfeksiyonlarda benzer düzeylerde olduğu görüldü. Viral enfeksiyonlardaki GSDMD'deki bu anlamlı yükselişin, ailevi Akdeniz ateşindeki seçici koruyuculuk hipotezine benzer şekilde, virüs enfeksiyonlarına karşı vücudu savunmada önemli bir mekanizma olduğunu düşündürmüştür. Buradan yola çıkarak, Coronavirus

enfeksiyonlarında GSDMD'nin faydalı etkilerinden yararlanmak veya enflamasyon oluşturunca zararlı etkilerinden korunmak amacıyla bu molekülü hedefleyen tedavilerin kullanılabileceği öne sürülmüştür (97). Benzer şekilde ailevi Akdeniz ateşi ataklarını önlemek amacıyla GSDMD hedefli tedaviler kullanılabilir.

Ailevi Akdeniz ateşi otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalık olarak tanımlanmakla beraber klasik otozomal resesif hastalıklardan işlevsel kazanım mutasyonu olması ve tek mutasyonun hastalığa sebep olabilmesi nedenleriyle farklıdır (94). İlgili gendeki ekzon 10 mutasyonları daha ağır hastalığa sebep olabilmekle beraber genotip-fenotip ilişkisi net değildir (98,99). Çalışmaya dahil edilen ailevi Akdeniz ateşi hastalarının hemen tamamı ekzon 10 mutasyonu taşımaktaydı. Tek ve iki allelde mutasyon taşıyan hastalarda akut faz yanıtları, IL-1B ve IL-18 sitokin düzeyleri ve GSDMD gen ekspresyonları açısından fark bulunmaması literatürdeki genotip-fenotip uyumsuzluğunu moleküler olarak destekler özellikte idi.

Sonuç olarak, ailevi Akdeniz ateşinde GSDMD atakların oluşumunda kritik özelliktedir. Gelecekte GSDMD hedefli tedavilerin geliştirilmesi ile hastalık atakları önenebilir. İnterlökin-1B ve IL-18 atak ve atak arası dönemde yüksektir ve büyük olasılıkla kronik enflamasyonun bir göstergesidir. Kolşisin tedavisi proenflamatuvar sitokinleri düşürmede etkindir. Enfeksiyonlara karşı oluşan enflamatuvar yanıtta GSDMD önemlidir. Çalışmaya alınan akut enfeksiyon kaynaklı ateşi olan hasta sayısı düşük olmasına rağmen, viral enfeksiyonlardaki GSDMD gen ifadesinin bakteriyel enfeksiyonlardan daha yüksek olduğunun gösterilmesi hem ağır viral enfeksiyonlardaki mekanizmaları anlamak hem de gelecekte hedefe yönelik tedavi olarak kullanılabilirliğini ortaya sermek bakımından önemlidir. Ailevi Akdeniz ateşi klasik olarak ateş ve poliserözite yol açan bir otoenflamatuvar hastalık olsa da genetik mutasyon, klinik bulgular ve bu bulguların şiddeti arasında net bir ilişki olmadığı gibi, moleküler açıdan da bir korelasyonun olmadığı bu çalışma ile gösterilmiştir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Ailevi Akdeniz ateşi ataklarında gasdermin-D kritik roldedir. Gen ekspresyonu hastalık ataklarında belirgin artar, atak arası dönemde ise normale döner. Gasdermin-D düzeyi akut faz proteinleri ile koreledir. Gelecekte gasdermin-D hedefli tedavilerin geliştirilmesi ile hastalık atakları önlenabilir.
- Ailevi Akdeniz ateşinde IL-1B ve IL-18 atak ve atak arası dönemde yüksektir ve kronik enflamasyonun bir göstergesi olabilir. Kolşisin tedavisi proenflamatuvar sitokin düzeylerini baskılayabilir.
- Enfeksiyonlara karşı oluşan enflamatuvar yanıtta gasdermin-D önemlidir. Viral enfeksiyonlarda Gasdermin-D gen ifadesi bakteriyel enfeksiyonlara kıyasla daha yüksek olabilir. Ağır viral enfeksiyonların tedavisinde gasdermin-D hedefli tedaviler gündeme gelebilir.
- Ailevi Akdeniz ateşi klasik olarak ateş ve poliserözite yol açan bir otoenflamatuvar hastalık olmasına rağmen genetik mutasyon ile moleküler belirteçler (IL-1B, IL-18, gasdermin-D gen ifadesi) arasında belirgin bir ilişki bulunmamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Guo H, Callaway JB, Ting JPY. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21(7):677–87.
2. Akula MK, Shi M, Jiang Z, Foster CE, Miao D, Li AS, et al. Control of the innate immune response by the mevalonate pathway. *Nat Immunol*. 2016;17(8):922–9.
3. Gao W, Yang J, Liu W, Wang Y, Shao F. Site-specific phosphorylation and microtubule dynamics control Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(33):E4857–66.
4. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: The molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. Vol. 27, *Annual Review of Immunology*. 2009. p. 621–68.
5. Savic S, Caseley EA, McDermott MF. Moving towards a systems-based classification of innate immune-mediated diseases. Vol. 16, *Nature Reviews Rheumatology*. 2020. p. 222–37.
6. Manthiram K, Zhou Q, Aksentijevich I, Kastner DL. The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. *Nat Immunol*. 2017;18(8):832–42.
7. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, Cheng J, Liu PP, Feigenbaum L, et al. Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 β Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity* [Internet]. 2011;34(5):755–68. Available from: <https://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.020>
8. Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ, et al. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006;103(26):9982–7. Available from: www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0602081103
9. Burdette BE, Esparza AN, Zhu H, Wang S. Gasdermin D in pyroptosis. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2021;11(9):2768–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.006>
10. Orning P, Lien E, Fitzgerald KA. Gasdermins and their role in immunity and inflammation. *J Exp Med*. 2019;216(11):2453–65.
11. Jorch SK, McNally A, Berger P, Wolf J, Kaiser K, Chetrusca Covash A, et al. Complex regulation of alarmins S100A8/A9 and secretion via Gasdermin-D pores exacerbates autoinflammation in Familial Mediterranean Fever. *J Allergy Clin Immunol*. 2023;S0091-6749-7.
12. Skendros P, Chrysanthopoulou A, Rousset F, Kambas K, Arampatzioglou A, Mitsios A, et al. Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) links stress with IL-1 b – mediated familial Mediterranean fever

- attack through autophagy-driven neutrophil extracellular traps. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(5):1378–87.
13. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. Vol. 28, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2012. p. 137–61.
 14. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell*. 2002;10(2):417–26.
 15. Stehlik C, Lee SH, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed JC. Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Is a Regulator of Procaspace-1 Activation. *J Immunol*. 2003;171(11):6154–63.
 16. Broderick L, De Nardo D, Franklin BS, Hoffman HM, Latz E. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2015;10:395–424.
 17. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Vol. 73, *Infection and Immunity*. 2005. p. 1907–16.
 18. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*. 2015;526(7575):666–71.
 19. Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*. 2016;535(7610):111–6.
 20. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1136–42.
 21. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, et al. The adaptor ASC has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nat Immunol*. 2014;15(8):727–37.
 22. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, et al. The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1590–604.
 23. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 397–411.
 24. Eldridge MJG, Sanchez-Garrido J, Hoben GF, Goddard PJ, Shenoy AR. The Atypical Ubiquitin E2 Conjugase UBE2L3 Is an Indirect Caspase-1 Target and Controls IL-1 β Secretion by Inflammasomes. *Cell Rep*. 2017;18(5):1285–97.
 25. Stein R, Kapplusch F, Heymann MC, Russ S, Staroske W, Hedrich CM, et al. Enzymatically inactive procaspase 1 stabilizes the ASC pyroptosome and supports pyroptosome spreading during cell division. *J Biol Chem*. 2016;291(35):18419–29.

26. Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C. The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. Vol. 76, Cytokine. 2015. p. 25–37.
27. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β - mediated in fl ammation in familial Mediterranean fever. 2016;269–77.
28. McGonagle D, McDermott MF. A proposed classification of the immunological diseases. PLoS Med. 2006;3(8):1242–8.
29. Ben-Chetrit E, Gattorno M, Gul A, Kastner DL, Lachmann HJ, Touitou I, et al. Consensus proposal for taxonomy and definition of the autoinflammatory diseases (AIDS): A Delphi study. Ann Rheum Dis. 2018;77(11):1558–65.
30. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentijevich I, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. Blood [Internet]. 2001;98(3):851–9. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/98/3/851/1675934/h8150100851.pdf>
31. Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL, Aksentijevich I. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. Front Immunol. 2019;10:1745.
32. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. Nature [Internet]. 2014;513(7517):237–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13449>
33. Park Y, Wood G, Kastner D, Chae J. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. Nat Immunol. 2016;17(8):914–21.
34. Jones J, Dangl J. The plant immune system. Nature. 2006;444(7117):323–9.
35. Moghaddas F, Llamas R, De Nardo D, Martinez-Banaclocha H, Martinez-Garcia JJ, Mesa-Del-Castillo P, et al. A novel Pyrin-Associated Autoinflammation with Neutrophilic Dermatitis mutation further defines 14-3-3 binding of pyrin and distinction to Familial Mediterranean Fever. Ann Rheum Dis. 2017;76(12):2085–94.
36. Adwan MH. A brief history of familial mediterranean fever. Vol. 36, Saudi Medical Journal. 2015. p. 1126–7.
37. Aksentijevich I, Centola M, Deng Z, Sood R, Balow J, Wood G, et al. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. Cell. 1997;90(4):797–807.
38. Consortium FF. A candidate gene for familial Mediterranean fever. Nat Genet. 1997 Sep;17(1):25–31.
39. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, William Ogunkolade B, Centola M, 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(1):133–44.

40. Papin S, Cuenin S, Agostini L, Martinon F, Werner S, Beer HD, et al. The SPRY domain of pyrin, mutated in familial mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 β processing. *Cell Death Differ.* 2007;14(8):1457–66.
41. Ben-Chetrit E, Yazici H. Familial Mediterranean fever: different faces around the world. *Clin Exp Rheumatol.* 2019;37(Suppl 121 (6)):18–22.
42. Ozen S, Karaaslan Y, Ozdemir O, Saatci U, Bakkaloglu A, Koroglu E, et al. Prevalence of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study. *J Rheumatol.* 1998;25:2445–9.
43. Soylemezoglu O, Kandur Y, Gonen S, Duzova A, Ozcakar Z, Fidan K, et al. Familial Mediterranean fever gene mutation frequencies in a sample Turkish population. *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34(6 Suppl 102):97–100.
44. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet.* 1998;351(9103):659–64.
45. Goldfinger SE. Colchicine for Familial Mediterranean Fever. *N Engl J Med.* 1972;287:1302.
46. Zemer D, Revach M, Pras M, Modan B, Schor S, Sohar E, et al. A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med.* 1974;291(18):932–4.
47. Hentgen V, Vinit C, Fayand A, Georgin-Lavialle S. The use of interleukine-1 inhibitors in familial Mediterranean fever patients: a narrative review. *Front Immunol.* 2020;11:1–11.
48. MEFV sequence variants [Internet]. Available from: <https://infEVERS.umai-montpellier.fr>
49. Shinar Y, Ceccherini I, Rowczenio D, Aksentijevich I, Arostegui J, Ben-Chetrit E, et al. ISSAID/EMQN Best Practice Guidelines for the Genetic Diagnosis of Monogenic Autoinflammatory Diseases in the Next-Generation Sequencing Era. *Clin Chem.* 2020;66(4):525–36.
50. Chae JJ, Wood G, Richard K, Jaffe H, Colburn NT, Masters SL, et al. The Familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF- κ B through its N-terminal fragment. *Blood.* 2008;112(5):1794–803.
51. Weinert C, Grütter C, Roschitzki-Voser H, Mittl P, Grütter M. The crystal structure of human pyrin b30.2 domain: implications for mutations associated with familial Mediterranean fever. *J Mol Biol.* 2009;394:226–36.
52. Öztürk K, Coşkun T, Bağlan E, Sönmez HE, Yener GO, Çakmak F, et al. Real-life data from the largest pediatric familial Mediterranean fever cohort. *Front Pediatr.* 2022;9:805919.
53. Aydın PÖA, Özçakar ZB, Aydın F, Karakaş HD, Çakar N, Yalçınkaya F. The Characteristics of Pediatric Patients with Familial Mediterranean Fever Treated with Anti-Interleukin-1 Treatment. *Turkish Arch Pediatr.* 2022;57(4):448–52.

54. Avar-Aydın PO, Ozcakar ZB, Aydın F, Karakas HD, Cakar N, Yalcinkaya F. The expanded spectrum of arthritis in children with familial Mediterranean fever. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2022;(123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s10067-022-06082-6>
55. Bernot A, Da Silva C, Petit J-L, Cruaud C, Caloustian C, Castet V, et al. Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet*. 1998;7(8).
56. Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial Mediterranean fever in the world. *Arthritis Care Res*. 2009;61(10):1447–53.
57. Aydın F, Cakar N, Ozcakar Z, Uncu N, Basaran O, Ozdel S, et al. Clinical features and disease severity of Turkish FMF children carrying E148Q mutation. *J Clin Lab Anal*. 2019;33(4):e22852.
58. Arici ZS, Romano M, Piskin D, Guzel F, Sahin S, Berard RA, et al. Evaluation of E148Q and Concomitant AA Amyloidosis in Patients with Familial Mediterranean Fever. *J Clin Med* [Internet]. 2021;10:3511. Available from: <https://doi.org/10.3390/jcm10163511>
59. Jamilloux Y, Lefeuvre L, Magnotti F, Martin A, Laurent A, Re V, et al. Familial Mediterranean fever mutations are hypermorphic mutations that specifically decrease the activation threshold of the Pyrin inflammasome. *Rheumatol*. 2018;57(1):100–11.
60. Gül A. Dynamics of Inflammatory Response in Autoinflammatory Disorders : Autonomous and Hyperinflammatory. 2018;9(October).
61. Hwan Park Y, Remmers EF, Lee W, Ombrello AK, Chung LK, Shilei Z, et al. Ancient familial Mediterranean fever mutations in human pyrin and resistance to *Yersinia pestis*. *Nat Immunol* [Internet]. 2020;21(8):857–67. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0705-6>
62. Van Gorp H, Saavedra PHV, De Vasconcelos NM, Van Opdenbosch N, Walle L Vande, Matusiak M, et al. Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(50):14384–9.
63. Holzinger D, Foell D, Kessel C. The role of S100 proteins in the pathogenesis and monitoring of autoinflammatory diseases. *Mol Cell Pediatr*. 2018;5(1):7.
64. Fischer FA, Chen KW, Bezbradica JS. Posttranslational and Therapeutic Control of Gasdermin-Mediated Pyroptosis and Inflammation. *Front Immunol*. 2021;12:661162.
65. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):269–77.
66. Hinze CH, Suzuki M, Klein-Gitelman M, Passo MH, Olson J, Singer NG, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2772–81.

67. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31(8):318–24.
68. Saitoh T, Akira S. Regulation of inflammasomes by autophagy. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(1):28–36.
69. Harel M, Fauteux-Daniel S, Girard-Guyonvarc'h C, Gabay C. Balance between Interleukin-18 and Interleukin-18 binding protein in auto-inflammatory diseases. *Cytokine.* 2022;150:155781.
70. Arena WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:27–55.
71. Mortensen SB, Hansen ABE, Mogensen TH, Jakobsen MA, Beck HC, Harvald EB, et al. Pyrin Inflammasome Activation Abrogates Interleukin-1 Receptor Antagonist, Suggesting a New Mechanism Underlying Familial Mediterranean Fever Pathogenesis. *Arthritis Rheumatol.* 2021;73(11):2116–26.
72. Chung LK, Park YH, Zheng Y, Kastner DL, Chae JJ, Bliska JB, et al. The Yersinia Virulence Factor YopM Hijacks Host Kinases to Inhibit Type III Effector-Triggered Activation of the Pyrin Inflammasome Article The Yersinia Virulence Factor YopM Hijacks Host Kinases to Inhibit Type III Effector-Triggered Activation of the Py. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;20(3):296–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.018>
73. Voight BF, Kudaravalli S, Wen X, Pritchard JK. A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biol.* 2006;4(3):0446–58.
74. Ozen S, Balci B, Ozkara S, Ozcan A, Yilmaz E, Besbas N, et al. Is there a heterozygote advantage for familial Mediterranean fever carriers against tuberculosis infections: Speculations remain? [4]. Vol. 20, *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2002.
75. Karadag O, Tufan A, Yazisiz V, Ureten K, Yilmaz S, Cinar M, et al. The factors considered as trigger for the attacks in patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int.* 2013;33(4):893–7.
76. Aydin O, Egeli BH, Ozdogan H, Ugurlu S. Late-onset familial mediterranean fever: single-center experience and literature review. *Intern Emerg Med.* 2022;17(5):1301–6.
77. Yıldırım DG, Gönen S, Fidan K, Söylemezoğlu O. Does age at onset affect the clinical presentation of familial Mediterranean fever in children? *J Clin Rheumatol.* 2022;28(1):E125–8.
78. Yıldırım DG, Senol PE, Soylemezoglu O. Predictors of persistent inflammation in children with familial Mediterranean fever. 2021;(July):1–5.
79. Avar-Aydın PÖ, Özçakar ZB, Aydın F, Karakaş HD, Çakar N, Yalçınkaya F. Erysipelas-Like Erythema: A Manifestation of Severe Disease Phenotype in Pediatric Patients with Familial Mediterranean Fever. *Turkish Arch Pediatr.* 2022;57(6):599–602.

80. Yıldırım DG, Bakkaloglu SA, Buyan N. Protracted febrile myalgia as a challenging manifestation of familial Mediterranean fever: case-based review. *Rheumatol Int.* 2019;39(1):147–52.
81. Kışla Ekinci RM, Balci S, Akay E, Doğruel D, Altıntaş DU, Yilmaz M. Disease severity and genotype affect physical growth in children with familial mediterranean fever. *Arch Rheumatol.* 2019;34(3):288–93.
82. Tekin M, Yalçinkaya F, Tumer N, Akar N, Misirlioğlu M, Çakar N. Clinical, laboratory and molecular characteristics of children with Familial Mediterranean Fever-associated vasculitis. *Acta Paediatr.* 2000;89:177–82.
83. Ozen S, Georgin-Lavialle SA, Watad A, Watad@sheba A, Bragazzi NL, Adawi M, et al. FMF Is Associated With a Wide Spectrum of MHC Class I- and Allied SpA Disorders but Not With Classical MHC Class II-Associated Autoimmune Disease: Insights From a Large Cohort Study. *Front Immunol* | www.frontiersin.org [Internet]. 2019;10:2733. Available from: www.frontiersin.org
84. Avar-Aydın PO, Ozcakar ZB, Cakar N, Fitoz S, Karakas HD, Yalcinkaya F. Nutcracker syndrome: a potentially underdiagnosed cause of proteinuria in children with familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2021;(123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00467-021-05337-9>
85. Touitou I, Sarkisian T, Medlej-Hashim M, Tunca M, Livneh A, Cattan D, et al. Country as the primary risk factor for renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 2007;56(5):1706–12.
86. Yalçinkaya F, Özen S, Özçakar ZB, Aktay N, Çakar N, Düzova A, et al. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology.* 2009;48:395–8.
87. Gattorno M, Hofer M, Federici S, Vanoni F, Bovis F, Aksentijevich I, et al. Classification criteria for autoinflammatory recurrent fevers. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(8):1025–32.
88. Neyzi O, Günöz H, Furman A, Bundak R, Gökçay G, Darendeliler F, et al. Türk çocuklarında vücut ağırlığı, boy uzunluğu, baş çevresi ve vücut kitle indeksi referans değerleri. *Cocuk Sagligi ve Hast Derg.* 2008;51(1):1–14.
89. Sangiorgi E, Rigante D. The Clinical Chameleon of Autoinflammatory Diseases in Children. Vol. 11, Cells. 2022.
90. Yıldırım K, Uzkeser H, Keles M, Karatay S, Kiziltunc A, Kaya MD, et al. Relationship between serum interleukin-1 β levels and acute phase response proteins in patients with familial Mediterranean fever. *Biochem Medica.* 2012;22(1):109–13.
91. Gang N, Drenth JPH, Langevitz P, Zemer D, Brezniak N, Pras M, et al. Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol.* 1999;26(4):890–7.
92. Gohar F, Orak B, Kallinich T, Jeske M, Lieber M, von Bernuth H, et al. Correlation of Secretory Activity of Neutrophils With Genotype in Patients

- With Familial Mediterranean Fever. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(12):3010–22.
93. Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1 β secretion in patients with familial Mediterranean fever: Correlation with MEFV genotype. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(2):462–9.
 94. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, Cheng J, Liu PP, Feigenbaum L, et al. Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1 β Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity.* 2011;34(5):755–68.
 95. Kanneganti A, Malireddi RKS, Saavedra PH V, Walle L Vande, Gorp H Van, Kambara H. GSDMD is critical for autoinflammatory pathology in a mouse model of Familial Mediterranean Fever. *J Exp Med.* 2018;215(6):1519–29.
 96. Booty LM, Bryant CE. Gasdermin D and Beyond – Gasdermin-mediated Pyroptosis in Bacterial Infections. Vol. 434, *Journal of Molecular Biology.* 2022.
 97. Liu X, Ding S, Liu P. The Roles of Gasdermin D in Coronavirus Infection and Evasion. *Front Microbiol.* 2021;12.
 98. Gangemi S, Manti S, Procopio V, Casciaro M, Di Salvo E, Cutrupi M, et al. Lack of clear and univocal genotype-phenotype correlation in familial Mediterranean fever patients: A systematic review. *Clin Genet.* 2018;94(1):81–94.
 99. Ayaz NA, Tanatar A, Karadağ ŞG, Çakan M, Keskindemirci G, Sönmez HE. Comorbidities and phenotype-genotype correlation in children with familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int [Internet].* 2021;41(1):113–20. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00296-020-04592-7>

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni

Tarih: 17/04/2023 13:48
 Sayı: E.1666/157.030.01.04
 00002793739




HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KURUL KARARI

OTURUM TARİHİ	OTURUM SAYISI	KARAR SAYISI
04.04.2023	2023/06	2023/06-58
Araştırma Numarası : GO 21/1062		Onay Tarihi : 05.10.2021

Kurulumuzun 05.10.2021 tarihli toplantısında GO 21/1062 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Deniz Çağdaş AYYAZ'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Dr. Öğr. Gör. Sevil Oskay HALAÇLI, Arş. Dilan İNAN, Arş. Gör. İsmail YAZ ile birlikte çalışacakları ve Uzm. Dr. Pınar Özge Avar AYDIN'ın yüksek lisans tezi olan, GO 21/1062 kayıt numaralı, **"Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Otoenflamasyon ve Otofajinin İncelenmesi"** başlıklı proje için vermiş olduğunuz protokol revizyonu ve başlık değişikliği talebi dilekçeniz Kurulumuzun 04.04.2023 tarihli toplantısında görüşülmüş ve **uygun bulunmuştur**. Projenin yeni başlığı **"Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Otoenflamasyonun İncelenmesi"** olarak belirlenmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir.

Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

Prof. Dr. Nüket PAKSOY ERBAYDAR Kurul Başkanı	Prof. Dr. Güzide Burça AYDIN Kurul Üyesi	Prof. Dr. Mehmet Özgür UYANIK Kurul Üyesi	Prof. Dr. Ayşe KİN İŞLER Kurul Üyesi
Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN Kurul Üyesi	Prof. Dr. Burcu Balam DOĞU Kurul Üyesi	Prof. Dr. Tolga YILDIRIM Kurul Üyesi	Prof. Dr. Hande GÜNEY DENİZ Kurul Üyesi
Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK Kurul Üyesi	Doç. Dr. Merve BATUK Kurul Üyesi	Doç. Dr. Gülten IŞIK KOÇ Kurul Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR Kurul Üyesi
Dr. Öğr. Üyesi Burcu Ersöz ALAN Kurul Üyesi	İZİNLI Av. Buket ÇINAR Kurul Üyesi		

EK-2: Yüksek Lisans Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Otoenflamasyonun İncelenmesi

ORJİNALLİK RAPORU

%**7**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**5**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Sahin, Ceren, and Feyza Aricioglu. "A Novel Aspect for Depression and Cytokine Hypothesis: \NLRP3 Inflammasome\", Journal of Marmara University Institute of Health Sciences, 2013. Yayın	% 1
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	"Textbook of Autoinflammation", Springer Nature, 2019 Yayın	<% 1
6	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<% 1

EK-3: Orijinallik Dijital Makbuz

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Pınar Özge Avar Aydın
 Ödev başlığı: Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Otoenflamasyonun
 Gönderi Başlığı: Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Otoenflamasyonun İncelen...
 Dosya adı: 2023_06_06_FMF_GSDMD.docx
 Dosya boyutu: 1.39M
 Sayfa sayısı: 56
 Kelime sayısı: 8,278
 Karakter sayısı: 57,746
 Gönderim Tarihi: 05-Haz-2023 09:10ÖÖ (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2109237666



9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Pınar Özge AVAR AYDIN

