

T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakóltesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA
MİTOKONDRIYAL DNA KOPYA SAYISI
DEĞİŞİKLİKLERİNİN AMİLOİDOZİS GELİŞİMİ
RİSKİ İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Haktan Bağış ERDEM

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdulgani TATAR

ERZURUM – 2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İLGİ: 23.02.2017 tarih ve 42190979-302.14.05-E.1700059655 sayılı yazınız.

TIPTA UZMANLIK TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi Arş.Gör.Dr. Haktan Bağış ERDEM'in "Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında, Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin, Amiloidozis Gelişimi Riski ile İlişkinin Değerlendirilmesi" konulu tezini incelemek üzere oluşturulan tez jürisine üye olarak seçildiğimizin ilgi yazınızla bildirilmesi üzerine jüri üyeleri, 01.03.2017 tarihinde toplanmış ve ilgili öğrenci tez savunmasına alınmıştır.

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunmasının tamamlanması sonucunda adı geçenin tezi jüri üyelerince oy birliği ile kabul edilmiştir.

Bilgilerinize arz ederiz.


Prof.Dr. Abdulkani TATAR
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı


Prof.Dr. Mevlit İKBAL
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi


Yrd.Doç.Dr.Kenan DELİL
Marmara Üniversitesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi.....	4
2.1.1. Tanım	4
2.1.2. Tarihçe.....	4
2.1.3. Patogenez	5
2.1.4. Fenotip-Genotip İlişkisi	8
2.1.5. Klinik Tanı	10
2.1.5.1. Tekrarlayan Ateş	12
2.1.5.2. Karın Ağrısı.....	13
2.1.5.3. Göğüs Ağrısı	13
2.1.5.4. Artralji/Artrit	14
2.1.5.5. Miyalji.....	15
2.1.5.6. Cilt Bulguları.....	16
2.1.5.7. Diğer Klinik Bulgular	17
2.1.5.8. Amiloidozis.....	17
2.1.5.9. AAA'ya Eşlik Eden Vaskülitler.....	19
2.1.6. Laboratuvar Bulguları	21
2.1.7. Tedavi.....	22
2.1.8. Prognoz	23
2.2. Mitokondri	23
2.2.1. Mitokondriyal DNA	27
2.2.2. Mitokondriyal DNA Replikasyonu	30

2.2.3. Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin AAA ile İlişkisi.....	32
2.3. Real-Time PCR	33
2.3.1. Real Time-PCR’da Kullanılan Prob Sistemleri ve Boyalar	33
2.3.2. Taqman Prob	33
2.3.3. Moleküler Boncuk Yöntemi.....	35
2.3.4. Hibridizasyon Prob Yöntemi	36
2.3.5. Sybr Green I	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Hastaların Seçimi ve Kayıtların Tutulması	39
3.2. Veri Analizi	40
3.3. Moleküler Analizler	40
3.3.1. Total DNA İzolasyonu	40
3.3.1.1. İzolasyon Protokolü	40
3.3.1.2. Spektrofotometrede İzole Edilen DNA Örneklerinin Konsantrasyonunun Kantitatif Ölçümü.....	41
3.3.2. MEFV Geni Mutasyon Analizi	42
3.3.2.1. PCR ile MEFV Gen Bölgesinin Çoğaltılması.....	42
3.3.2.2. PCR Programı	42
3.3.2.3. Pyrosekans Yöntemi İle Dizi Analizi ve Mutasyonların Tespiti	43
3.3.3. MtDNA Kopya Sayısının Belirlenmesi	46
3.3.3.1. RT-PCR İçin Kullanılan Karışım.....	47
3.3.3.2. RT-PCR Programı.....	47
3.3.3.3. Sonuçların Analizi.....	48
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR	67

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Tel Hashomer kriterleri	11
Tablo 2. AAA ayırıcı tanısındaki hastalık ve durumlar	12
Tablo 3. Çalışmada kullanılan primer dizileri	44
Tablo 4. RT-PCR işlemi için kullanılan primerler ve ilgili gen bölgeleri.....	47
Tablo 5. AAA hastaları ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaş özellikleri	50
Tablo 6. AAA hastaları ve kontrol grubunda tespit edilen C_t değerleri.....	51
Tablo 7. AAA hastaları ve kontrol grubunda tespit edilen mtDNA kopya sayılarının istatistiksel analizi.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. AAA'nın tarihsel süreçler içerisinde Dünya üzerinde yayılımı.	1
Şekil 2. Pyrin proteininin yapısı	6
Şekil 3. Pyrin proteini ile ASC arasındaki ilişkinin şematik olarak gösterimi	7
Şekil 4. Pyrin proteininin üç boyutlu modellemesinde kliniği en çok etkileyen M694V ve M680I mutasyonlarının etkilediği bölgeler.	9
Şekil 5. Sık görülen MEFV mutasyonları.....	9
Şekil 6. Erezipel benzeri eritem	17
Şekil 7. Renal amiloidozisin ışık mikroskopunda hematoxilen eozin boyama ile elde edilmiş görüntüsü	19
Şekil 8. Mitokondrinin yapısı	24
Şekil 9. Elektron transport zinciri mekanizması	25
Şekil 10. Krebs siklusu mekanizması	26
Şekil 11. Mitokondriyal DNA'nın yapısı.	28
Şekil 12. Mitokondriyal DNA replikasyon mekanizması.....	31
Şekil 13. Taqman probu.....	34
Şekil 14. Moleküler boncuk yöntemi.....	35
Şekil 15. Hibridizasyon prob yöntemi	36
Şekil 16. SYBR Green metodu	37
Şekil 17. Bazı MEFV mutasyonlarının pyrosekans görüntüleri	45
Şekil 18. Pyromark Q24 pyrosekans cihazı	46
Şekil 19. Rotor-Gene-Q (Heidelberg, Germany) RT-PCR cihazı	48
Şekil 20. HBB geni için incelenen olguların amplifikasyon eğrileri	49
Şekil 21. ND-1 geni için incelenen olguların amplifikasyon eğrileri	49
Şekil 22. M694V homozigot mutasyonu saptanmış hastaların pyrosekans görüntüsü.....	50
Şekil 23. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında mtDNA kopya sayısı dağılımı	53
Şekil 24. Kontrol grubunda mtDNA kopya sayısı dağılımı.....	54

KISALTMALAR DİZİNİ

AAA	: Ailevi Akdeniz Ateşi
MtDNA	: Mitokondriyal DNA
IFN-γ	: İnterferon γ
TNF	: Tümör nekrozis faktör
IL-1β	: İnterlökin-1 β
BB-ZF	: B-box zinc finger domain
ASC	: Apoptosis associated speck like protein with a CARD
HSP	: Henoch Schönlein purpurası
PAN	: Poliarteritis nodosa
CRP	: C-reaktif protein
FADH₂	: Flavın adenin dinükleotit
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
nDNA	: Çekirdek DNA'sı
TFAM	: Transkripsiyon faktör A
POLG	: DNA polimeraz γ
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
OD	: Optik dansite
HBB	: β -globülin
ND-1	: NADH dehidrogenaz
OSB	: Otistik spektrum bozukluğu
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
SSRI	: Selektif serotonin reuptake inhibitörü
PET	: Pozitron emisyon tomografi
WES	: Whole exome sequencing

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik anabilim dalında ihtisas sürem boyunca bilgi ve desteklerini esirgemeyen tez hocam ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdulgani TATAR'a,

birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, tıbbi genetik camiasının gururu, kardeşim Araş. Gör. Dr. İbrahim ŞAHİN'e,

anabilim dalımızda görev yapan tüm arkadaşlarıma ve çok kıymetli personelimiz Abdullah ÖZÇELİK'e,

desteğini her daim hissettiğim, evlatları için hayatını ortaya koyan annem Filiz ERDEM ve anneannem Sebiha KIRAÇ başta olmak üzere, babam İsmail ERDEM, kardeşim Doğuş ERDEM, eşim Zeynep Sever ERDEM ve varlığı ile güç veren oğlum Yağız Kenan ERDEM'e,

son nefesine kadar üzerimize titreyen rahmetli dedem Lütfü KIRAÇ'a

ve son olarak vatanımızda huzur ve güven içerisinde yaşamamız ve çalışmamız için gece gündüz demeden canını ortaya koyarak mücadele eden kahraman güvenlik güçlerimize sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araş. Gör. Dr. Haktan Bağış ERDEM

ÖZET

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin Amiloidozis Gelişimi Riski ile İlişkisinin Değerlendirilmesi

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalığı Akdeniz kuşağındaki toplumlarda sık olarak görülen otozomal resesif geçişli otoinflamatuvar bir tek gen hastalığıdır. AAA Fenotip tip I, tekrarlayan ateş ve seröz zarların inflamasyonu (peritonitis, sinovitis veya plöritis) ile karakterize iken, fenotip II tanımı ise, tekrarlayan inflamasyon ve ateş öyküsü olmayan bir hastada, ilk bulgu olarak amiloidoz ortaya çıkması halinde kullanılmaktadır. AAA tanısının konmasında klinik bulgular, aile öyküsü, biyokimyasal testler ve genetik laboratuvar verileri kullanılmaktadır. AAA atak ve komplikasyonlarından korunmak için tek terapötik seçenek kolşisin molekülüdür.

Günümüzde AAA tanısının geç konması, hastanın kolşisin kullanımını aksatması veya kolşisine dirençli olmasından dolayı kronik böbrek yetmezliği sebebiyle genç yaşta rutin hemodiyaliz endikasyonu olan oldukça fazla miktarda hasta birey mevcuttur.

Romatizmal bir hastalık olan AAA hastalığında mitokondriyal DNA'daki kopya sayısı değişiklikleri ile mitokondriyal disfonksiyon zemininde bir fizyopatolojik temel olduğu düşünülmektedir. AAA gibi sınırlı biyobelirteçleri olan ve amiloidoz sonucunda kronik böbrek yetmezliği gibi sık ve önemli bir komplikasyonu olan bu hastalıkta, farklı klinik gruplarda saptanacak farklı mitokondriyal DNA kopya sayısı değişimlerinin, hastalığın tanı, takip ve komplikasyonlarının engellenmesinde önemli bir parametre olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda 50 kişilik AAA ile takipli, MEFV geninde M694V homozigot mutasyonunu taşıyan, amiloidozis geliştirmiş hasta grubu ve AAA klinik bulguları ve MEFV gen mutasyonları açısından negatif 50 kişilik kontrol grubu arasındaki mitokondriyal DNA kopya sayısı değişiklikleri incelenmiştir.

Sonuç olarak, amiloidozis geliştirmiş, M694V homozigot mutasyon taşıyıcısı AAA hastalarında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde mitokondriyal DNA

miktarında azalış tespit edilmiştir ($p<0.001$). Bu çalışma ile daha önce birçok hastalıkta mitokondriyal genomdaki değişiklikler üzerinden tespit edilmiş olan mitokondri disfonksiyonu, AAA hastalığı için de lökosit hücrelerinde mitokondriyal DNA kopya sayısının azaldığı gösterilerek tespit edilmiştir. Hastalığın kendi içerisindeki farklı klinik gruplar arasında mitokondriyal disfonksiyon şiddetinin değişimini anlayabilmek için farklı çalışma gruplarında yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi, mitokondriyal DNA, amiloidozis, MEFV



ABSTRACT

Evaluating the Relationship Between the Mitochondrial DNA Copy Number Alterations and Amyloidosis Risk in Familial Mediterranean Fever Patients

Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autosomal recessive monogenic autoinflammatory disease that is common in Mediterranean-populated communities. FMF Phenotype type I is characterized by recurrent fever and inflammation of the serous membranes (peritonitis, synovitis or pleuritis) whereas phenotype II is used in a patient without recurrent inflammation and fever with amyloidosis as the first finding. Clinical findings, family history, biochemical tests and genetic laboratory data are used in the diagnosis of FMF. The only therapeutic option to protect against FMF attacks and complications is colchicine molecule.

Currently, there is a very large number of patients who are indicated for renal hemodialysis due to chronic renal failure, because of delayed diagnosis of FMF and/or disability of the patient's use of colchicine or resistance to colchicine.

There may be a physiopathological basis for the mitochondrial dysfunction with changes in the number of mitochondrial DNA copies in FMF. FMF is a disease with limited biomarkers and amyloidosis that is a frequent and important complication, such as chronic renal failure. For this reason, it is considered that the changes in the number of different mitochondrial DNA copy number variations, detected in different clinical groups will be an important parameter in preventing the diagnosis, follow-up and complications of the disease.

In our study, changes in the mitochondrial DNA copy number between 50 patients with FMF, who have M694V homozygote mutation in MEFV gene and amyloidosis and 50 healthy controls, who have not any MEFV mutation or FMF clinical finding, were examined.

As a result, a significant decrease in the amount of mitochondrial DNA was detected in FMF patients with M694V homozygous mutation carriers who developed amyloidosis compared to the control group ($p < 0.001$). In this study, mitochondrial

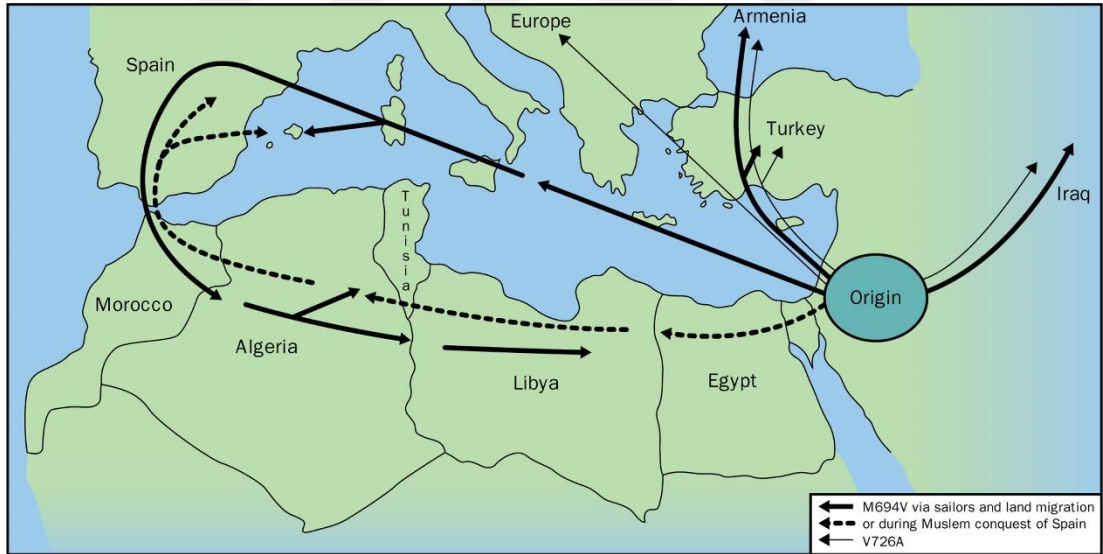
dysfunction, which has been identified through changes in the mitochondrial genome in many diseases, has been identified by showing that the copy number variations of mitochondrial DNA in leukocytes also decreases for FMF disease. New research is needed in different study groups to understand the change in severity of mitochondrial dysfunction among different clinical groups within the disease itself.

Key Words: Familial Mediterranean Fever, mitochondrial DNA, amyloidosis, MEFV



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA); otozomal resesif kalıtmı, tekrarlayan ateş atakları, seröz zarların inflamasyonu sonucu ortaya çıkan karın ağrısı, göğüs ağrısı ve artrit eşlik ettiği bir tek gen hastalığıdır (1). Köken aldığı Ortadoğu ve Anadolu toplumlarında taşıyıcı sıklığı %0,13-0,17 olmasının yanısıra Dünya’da bu bölgelerde sık olarak görülmektedir (2). Yunanistan, Polonya, Avustralya, Belçika, İtalya, Yunanistan ve Kübalılarda da hastalık gösterilmiştir (Şekil 1). Yirminci yüzyılda Avrupalılar arasında göçten dolayı dünyada yaygın görülen bir hastalıktır. Özellikle akraba evliliklerinin çok sık olduğu ülkemiz için ayrı bir öneme sahiptir. Daha önce yapılan çalışmalarda Türk toplumundaki AAA taşıyıcı sıklığı %20, prevalansı da 1/1075 olarak bildirilmektedir (3).



Şekil 1. AAA'nın tarihsel süreçler içerisinde Dünya üzerinde yayılımı (2).

Günümüzde AAA tanısının geç konması, hastanın kolşisin kullanımını aksatması veya kolşisine dirençli olmasından dolayı kronik böbrek yetmezliği sebebiyle genç yaşta rutin hemodiyaliz endikasyonu olan oldukça fazla miktarda hasta birey mevcuttur. Uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA

Konsorsiyumu, 1997 yılında birbirlerinden bağımsız olarak 16. kromozomun 16p13.3 bölgesi üzerindeki marenostin ve pyrin proteinlerini üreten MEFV (MEditerranean FeVer) genindeki mutasyonların AAA kliniğinden sorumlu olduğunu bildirmiştir (4, 5). Ülkemizde en sık görülen mutasyonları oluşturan M694V, M680I (G>C), M694I, V726A mutasyonları ve E148Q varyantı AAA hastalarındaki mutasyonların %74'ünü oluşturmaktadır (6, 7). Homozigot M694V mutasyonu dışında prognoz açısından MEFV geni üzerindeki diğer mutasyonların homozigot/heterozigot veya compound heterozigositesinin etkisi henüz net olarak sınıflandırılmamıştır. Amiloidozisle en çok ilişkili mutasyonun M694V homozigot mutasyonu olduğu gösterilmiştir. Özellikle sık görülen E148Q, V726A ve R202Q varyantlarının hastalıkla ilişkili olup olmadığı ve polimorfizm olarak değerlendirilmesi gerekip gerekmediği konuları hala araştırmacılar tarafından tartışılmaya devam etmektedir (8-10).

İnsan mitokondriyal DNA (mtDNA) çift zincirli ve sirküler bir yapıya sahiptir. Yaklaşık 16.569 nükleotitten oluşan insan mtDNA'sında protein üreten (coding) ve protein üretmeyen (non-coding) bölgeler bulunmaktadır. Mitokondri genomunda 2 rRNA, 22 tRNA, 13 mRNA olmak üzere toplam 37 gen bulunmaktadır (11). Ayrıca, mtDNA'nın bir hücre içerisinde bağımsız çoğalan çok fazla sayıda kopyası bulunur. Kopya sayısı hücre tipine göre 100 ile 100.000 arasında değişebilmektedir (12).

Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığının patolojisi genetik ve biyokimyasal faktörlere bağlansa da hastalık mekanizması tam olarak açığa kavuşturulamamıştır. Bazı romatolojik hastalıkların patogenezinde, mitokondriyal disfonksiyon sebebiyle yeterli ATP üretilmemesinin etkisi daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (13). Mitokondriyal genomdaki genetik değişiklikler mitokondriyal disfonksiyonun en önemli sebebidir. Bu değişikliklerden biri olan mtDNA kopya sayısı değişimlerinin birçok hastalıkta mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğu gösterilmiştir (14-16).

Romatizmal bir hastalık olan AAA hastalığında mtDNA'daki kopya sayısı değişimleriyle mitokondriyal disfonksiyon zemininde bir fizyopatolojik temel olduğu

düşünülmektedir. Daha önce farklı hastalıklarda yapılan çalışmalarda mtDNA kopya sayısının hastalık prognozunu belirlemede biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ailevi Akdeniz ateşi gibi sınırlı biyobelirteçleri olan ve amiloidoz sonucunda kronik böbrek yetmezliği gibi sık ve önemli bir komplikasyonu olan bir hastalıkta, farklı klinik gruplarda saptanacak farklı mtDNA kopya sayısı değişimlerinin, hastalığın tanı, takip ve komplikasyonlarının engellenmesinde önemli bir parametre olacağı düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi

2.1.1. Tanım

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA), özellikle Ortadoğu ve Akdeniz kökenli bazı toplumları etkileyen genellikle otozomal resesif geçişli bir tek gen hastalığıdır (1). Ülkemizde 1/1073 prevalans ile en sık görülen otoinflamatuvar hastalık olması sebebiyle, halk sağlığı açısından önemli arz etmektedir (17). Hastalık kendini tekrarlayan ateş, peritonit, sinovit, plörit ve nadiren perikardit ve menenjit atakları ile gösterir. Uzun dönem komplikasyonu olarak amyloid A (AA) proteininin birikimi, özellikle kronik böbrek yetmezliği ve bunun yanında kalp yetmezliğine yol açmaktadır (1). AAA hastalarının yaklaşık %90'ında klinik bulgular yirmi yaşından önce ortaya çıkar (18, 19) ve hastalık başlangıcı ortalama dört yaştır (20).

2.1.2. Tarihçe

AAA ilk kez 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından tekrarlayan ateş, abdominal ağrı ve lökositozu olan 16 yaşındaki Yahudi bir kız çocuğunda tanımlanmıştır (21). İlk olgudan sonra 1945 yılında Amerikalı araştırmacı Siegal, “Benign Paroksizmal Peritonitis” adı ile tekrarlayan ateş ve karın ağrısı atakları ile seyreden bir klinik antite tanımlamıştır (22). Reiman ise 1948 yılında “Periyodik hastalık” tanımlamasını kullanmıştır (23). Catton ve Mamou ilk kez 1951 yılında hastalığın ailevi olduğuna dikkat çekmişler ve 1956 yılında aynı yazarlar AAA hastalarında amiloidozis gelişebileceğini bildirmişlerdir (24). Heller ve Sohar 1958 yılında ilk kez “Ailevi Akdeniz Ateşi” tanımını kullanmışlar ve 1961 yılında aynı yazarlar hastalığın otozomal resesif kalıtıldığını göstermişlerdir (25). Türkiye’de ise ilk AAA hastası “Garip Bir Karın Ağrısı Sendromu” adı ile 1946 yılında Abrevaya Marmaralı tarafından bir erişkinde tanımlanmıştır (26).

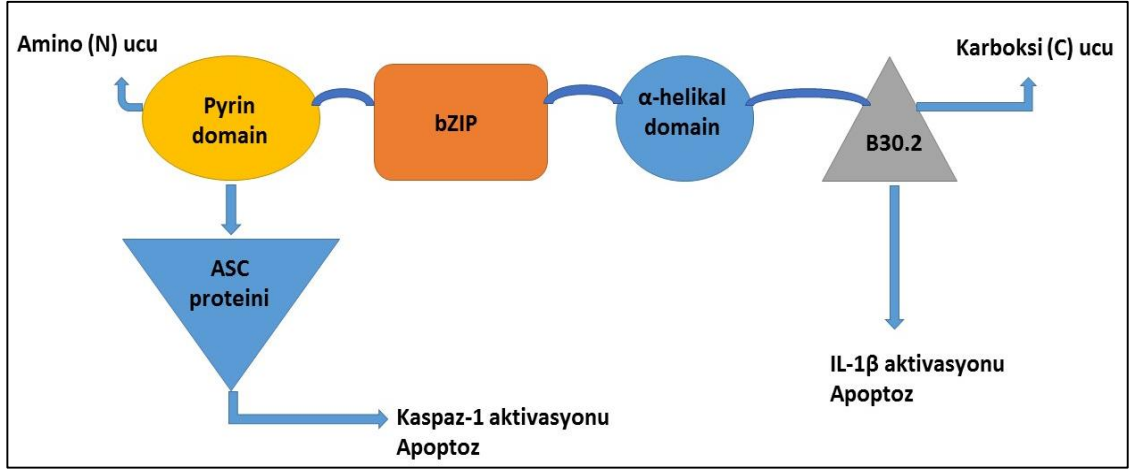
2.1.3. Patogenez

Uluslararası AAA Konsorsiyumu ve Fransız AAA Konsorsiyumu 1997 yılında birbirlerinden bağımsız olarak 16. kromozomun 16p13.3 bölgesi üzerindeki MEFV (MEditerranean FeVer) genindeki mutasyonların AAA kliniğinden sorumlu olduğunu bildirmiştir (4, 5). Büyüklüğü 15000 baz olan MEFV geni, 10 ekzondan oluşmakta ve 781 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Aynı anda bulunan genin oluşturduğu proteine Fransız AAA Konsorsiyumu “Mare nostrum” (bizim deniz); Uluslararası AAA Konsorsiyumu ise “Pyrin” (ateş) ismini vermiştir. MEFV geni daha çok periferik kandaki myeloid seri hücrelerinde (nötrofiller, eozinofiller, monositler) ekspresse edilmekle birlikte, sinoviyal fibroblastlar, periton ve ciltteki dentritik hücrelerde de ekspresse olmaktadır (27). Bu genin yoğunlukla ekspresse olduğu doku ve hücre gruplarının, AAA kliniğinde görülen serozal, sinoviyal ve dermatolojik bulgularla ilişkili olduğu görülmektedir. Proinflamatuvar etki yapan interferon γ (IFN γ), tümör nekrozis faktör (TNF), lipopolisakkarit, interlökin-1 β (IL-1 β) ve forbol miristat asetat gibi peptitler özellikle monositlerde MEFV gen ekspresyon düzeyini arttırmaktadır (28).

Ailevi Akdeniz ateşi ataklarının fizyopatolojik mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır; fakat pyrin proteininin yapısının bozulması sonucunda nötrofil aktivasyonuna bağlı olarak serozal yüzeylerde inflamasyon yanıtının arttığı tespit edilmiştir (29). Bu sebeple nötrofillerin fagositozunu ve kemotaksisini baskılayan kolşisin molekülü şu an için atakların tedavisi ve komplikasyonların önlenmesinde ilk ve tek alternatiftir (18, 30).

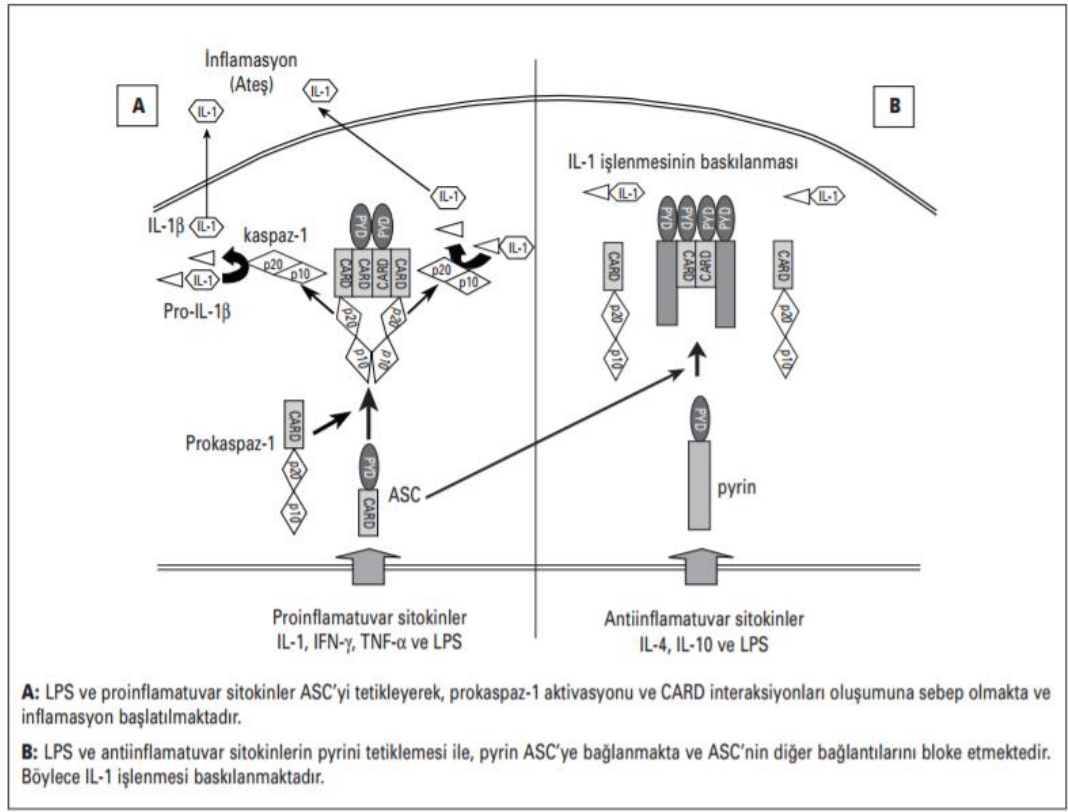
AAA patogenezinin sorumlu pyrin proteini, beş fonksiyonel alt üniteden oluşmaktadır (Şekil 2) (31):

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



Şekil 2. Pyrin proteininin yapısı

Pyrin, amino ucu PYRIN subüniti aracılığı ile ASC (Apoptosis associated speck like protein with a CARD) proteinine bağlanır. Bağlantıyı sağlayan ASC proteini; amino ucunda PYRIN domaini, karboksi ucunda CARD içeren adaptör bir proteindir (32), inflamazom kompleksinde yer alır, IL-1 β , IL-18, IL-33 peptitlerinin maturasyonuna ve kaspaz enziminin proteolitik aktivasyonuna aracılık eder (33, 34). Normal yapıdaki pyrinin B30.2 bölgesi, aktif kaspaz-1 alt birimleri olan p20 ve p10 ile etkileşime girerek, aktif p20/10 heterodimer oluşumunu önler. Mutant pyrinin B30.2 bölgesinin p20 ve p10 ile etkileşimi, normal yapıdaki pyrin 30.2 bölgesine göre daha azdır ve böylece p20 ve p10 heterodimeri oluşarak pyrini bZIP subünit ile B-box zinc finger subünit ortasındaki Asp330 bölgesinden ikiye ayırır. Oluşan N terminal pyrin parçası, NF- κ B aktivitesi, p65 NF- κ B'nin nukleusa girişini arttırarak ya da I κ B- α 'nın yıkılımını arttırarak arttırılır. Artan NF- κ B aktivitesi ise inflamatuvar sitokin salınımını arttırır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, monositlerde pyrin fonksiyonunun baskılanması sonucunda IL-1 β sekresyonunun bazı çalışmalarda arttığı bazılarında da baskılandığı görülmüştür (35-38). Pyrinin antiinflamatuvar veya proinflamatuvar mı olduğu, mutasyonların pyrin proteininde fonksiyon kaybı etkisine mi yoksa fonksiyon kazanımı etkisine mi sebep olduğu henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Şekil 3) (31).



Şekil 3. Pyrin proteinini ile ASC arasındaki ilişkinin şematik olarak gösterimi (39)

MEFV mutasyonlarının çoğunun pyrinin C terminal B30.2 subünitinde olduğu düşünüldüğünde, bu bölge üzerinden gerçekleşen kaspaz-1 inhibisyonunun AAA patogenezinin moleküler düzeyde açıklanmasında önemli olduğu düşünülmektedir (35). Pyrinin ve kaspaz-1'in üç boyutlu yapısı düşünüldüğünde, MEFV geni üzerindeki M694V ve M680I (G>C) mutasyonlarının, bu ara bağlanma yüzeyinde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak mutant pyrin ile kaspaz-1 arasındaki etkileşim azalarak, pyrinin IL-1β sekresyonu üzerindeki inhibitör etkisi azalmaktadır. Bu bilgiler ışığında AAA patogenezinde kontrolsüz kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1β sekresyonunun olduğu görülmektedir.

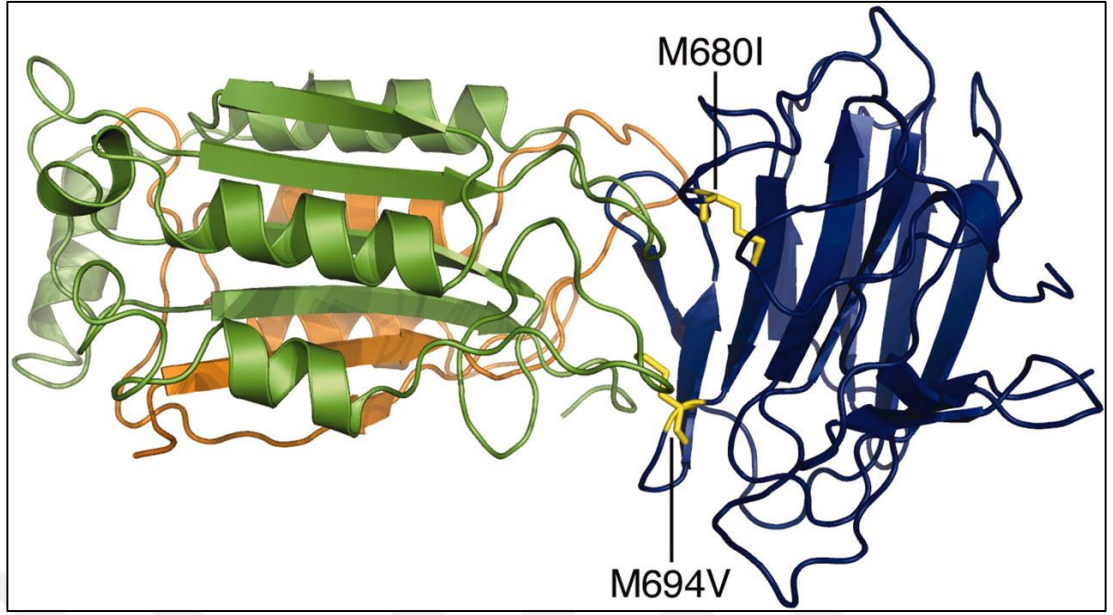
Patogenezde C5a/IL-8 inhibitör eksikliğinin de etkili olabileceği belirtilmiştir. Bu hipotezi ortaya atan araştırmacılar, granülositler için oldukça güçlü bir kemoatraktan olan C5a/IL8'i inhibe eden inhibitör eksikliğinin akut inflamatuvar atağa neden olabileceğini bildirmişlerdir (39). Sağlıklı kişilerin sinoviyal ve

peritoneal sıvılarında C5a/IL-8'in kemotaktik aktivitesini engelleyen inhibitör bir protein taşırlar. Bu protein normal koşullar altında çeşitli nedenlerle aktive olan C5a/IL-8'i inhibe ederek inflamasyonu kontrol etmektedir. Eksikliği durumunda ise seröz membranlarda inflamasyon ortaya çıkar. Yapılan çalışmalarda hastaların eklem ve sıvı örneklerinde C5a/IL-8 inhibitör aktivitesi saptanamamıştır (40, 41).

AAA hastalarında kısmen saptanabilen romatoid faktör, anti nükleer antikor, çift sarmal DNA antikorı gibi otoantikorlar, primer bir otoimmün mekanizmadan çok, inflamasyon temelinde ortaya çıkan non-spesifik bulgulardır.

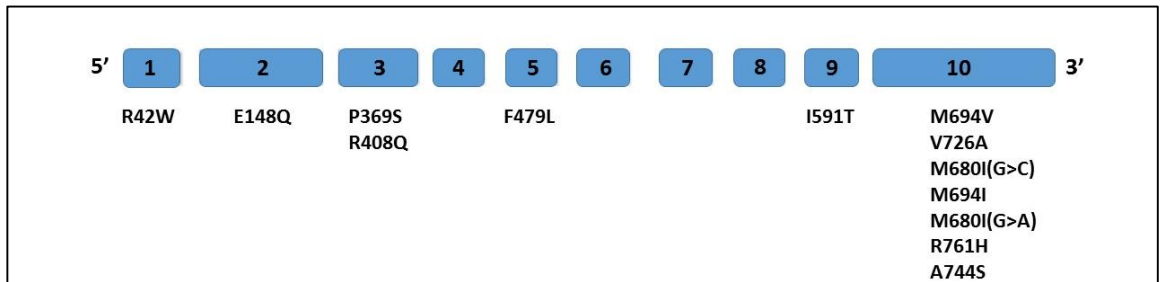
2.1.4. Fenotip-Genotip İlişkisi

Otoinflamasyon temelinde gerçekleşen hastalıkların varyasyon analizini yapmak için oluşturulmuş “infervers” veritabanına göre Temmuz 2016 itibarıyla MEFV geninde 314 varyasyon tanımlanmıştır (<https://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/>). Bu 314 varyasyondan 101 tanesi ekzon 2'de, 90 tanesi ekzon 10 üzerinde bulunmaktadır (42). En yaygın gözlenen mutasyonlar (M694V, M680I (G>C), M694I, V726A) pyrin proteininin C-terminal B30.2 subunitini kodlayan 10. ekzondadır (8). Bu bölge, pyrin proteininin asıl işlevini gördüğü N-ucundaki pyrin bölgesinin tam zıt ucunda olmakla beraber, proteinin işlevinde son derece önemli bir bölge olduğu düşünülmektedir. Klinik açıdan büyük önem taşıyan M694V mutasyonu, 10. ekzonun 2080. bazında adenin yerine guanin gelmesi sonucu metiyoninin valine dönüşmesiyle ortaya çıkan missense mutasyondur. M694V mutasyonu AAA hastaları arasında en sık rastlanan mutasyondur (8). M694V homozigot mutasyonunu taşıyan hastalarda; semptomların erken yaşta başlaması, atakların sık görülmesi, kolşisin direnci ve amiloidozis gelişimi riski yüksektir (8). MEFV geninin 2. ekzonunda tespit edilen E148Q varyasyonu ise, toplumun %10'unda taşıyıcılık tespit edilmiş ve homozigot olduğu durumlar dahil olmak üzere araştırmacılar tarafından, klinik vermemesi sebebiyle polimorfizm olarak kabul edilmektedir (43).



Şekil 4. Pyrin proteininin üç boyutlu modellemesinde kliniği en çok etkileyen M694V ve M680I mutasyonlarının etkilendiği bölgeler.

Tespit edilen MEFV mutasyonlarının çoğunluğu missense mutasyonlar olup (Şekil 5) nadiren delesyon veya duplikasyon tespit edilir (34, 44). Sadece iki mutasyonun stop kodon oluşmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu stop kodonlardan biri ekzon 2’de frame-shift mutasyon sonucunda diğeri de ekzon 10’da görülen nonsense mutasyon sonucunda oluşur (44).



Şekil 5. Sık görülen MEFV mutasyonları

Birçok kaynakta AAA’nın otozomal resesif geçişli olduğu belirtilse de taşıyıcı frekansının yüksek ve akraba evliliklerinin sık olduğu toplumlarda otozomal

dominant kalıtımı taklit edebilir. Pseudodominant kalıtıma benzeyen bu sonuç bazı kaynaklarda hastalığın otozomal dominant geçişli olduğunun ileri sürülmesine sebep olmuştur (45-47).

2.1.5. Klinik Tanı

Hastaların %90'ında şikayetler 20 yaşından önce, %60'ında ise 10 yaşından önce başlamaktadır (19). Otozomal bir hastalık olmasından dolayı kadın ve erkek hasta sayısının eşit olması beklenirken, yapılan bazı çalışmalarda kadın/erkek oranının 1,5/2 olduğu gösterilmiştir (18, 19). Ataklar 12-72 saat süren ateşli karın ağrıları ile karakterizedir. Eklem ve kas ağrıları atak sona erdikten sonra da devam edebilir. Ağır fiziksel aktivite, cerrahi öykü, enfeksiyon, depresyon ve menstruasyon dönemleri atakları tetikleyebilir. Atakların karakteri kişiden kişiye değişmekle birlikte, ataklar arasındaki dönemde tüm hastalar asemptomatiktir. İlerleyen dekatlarda atak sıklığı azalır ve atakların şiddeti hafifler (48).

Tanı için farklı tanı şemaları olmakla birlikte yetişkin AAA hastaları için ilk tanı skorlaması Tel Hashomer hastanesinde yapılmıştır (Tablo 1). Hastaya tanı konması için bir majör veya iki minör, veya bir minör ve beş destekleyici kriter, veya bir minör ve ilk beş destekleyici kriterin dördünün sağlanması gerekmektedir.

Tablo 1. Tel Hashomer kriterleri

Tel Hashomer Kriterleri	
Majör Kriterler	Minör Kriterler
Peritonit	İnkomplet ataklar
Plevrit (unilateral) veya perikardit	Eforla bacak ağrısı
Monoartrit	Kolşisine yanıt
Ateş	
Destekleyici kriterler	
Aile öyküsü	
Toplumsal yatkınlık	
20 yaşından önce başlayan semptomlar	
Şiddetli, yatak istirahati gerektiren ataklar	
Atakların kendiliğinden remisyona girmesi	
Ataksız dönemlerin olması	
AAA ile ilişkili laboratuvar parametrelerinin pozitifliği	
Epizodik proteinüri-hematüri	
Negatif laparotomi bulgusu veya apendektomi öyküsü	
Ebeveynlerde akrabalık öyküsü	

AAA hastaları klinik açıdan üç fenotipte incelenir:

Fenotip 1; sıklıkla birinci veya ikinci dekatta başlayan, serozal yüzeylerde inflamasyonla beraber görülen ateş atakları ile karakterizedir.

Fenotip 2; tekrarlayan inflamasyon ve ateş öyküsü olmayan bir hastada, ilk bulgu olarak amiloidozis ortaya çıkması halinde kullanılmaktadır.

Fenotip 3 ise; MEFV gen mutasyonu taşımayan bireylerde kolşisine yanıt veren AAA benzeri ataklar görülmesidir. Toplumlara göre klinik özelliklerin sıklığı değişiklik gösterebilmektedir (49-52).

Birçok sistemle ilgili belirti ve bulguların olması nedeniyle birçok hastalığın ayrııcı tanıda düşünülmesi gerekmektedir (53) (Tablo 2).

Tablo 2. AAA ayırıcı tanısındaki hastalık ve durumlar (53).

Ateşli karın ağrısı atakları	İzole ateş atakları	Ateşsiz karın ağrısı atakları
Pyelonefrit İdrar yolu enfeksiyonları Pelvik inflamatuvar hastalık Pankreatit İnflamatuvar bağırsak hastalığı Hiper IgD sendromu Kronik divertikülit / apandisit	PFAPA HIDS Crohn hastalığı Alerjik reaksiyon Siklik nötropeni Lenfoma Malarya	Nefrolitiazis Kolelitiazis Peptik ülser Ovulasyon / menstrasyon Orak hücreli anemi Abdominal epilepsi Hereditör anjiyoödem Porfiri Abdominal anjina
Eklem atakları	Skrotal ataklar	Göğüs ağrısı atakları
Behçet hastalığı Reiter sendromu Spondiloartropati Sarkoidozis Juvenil idiyopatik artrit Gut Menisküs yırtıkları Septik artrit Romatizmal ateş	Testis torsiyonu Epididimit Orşit Behçet hastalığı	İnfeksiyöz plöroperikardit Otoimmün plöroperikardit Tekrarlayan benign perikardit Tekrarlayan pulmoner emboli Plöropnömoni

2.1.5.1. Tekrarlayan Ateş

Ataklara eşlik eden en önemli bulgu ateş olmasına rağmen, nadiren ateşle seyretmeyen ataklar raporlanmıştır (54, 55). Ateş düzeyi 38°C'nin üzerinde atak süresince devam eder. Aniden yükselen ateş plato fazı çizdikten sonra yine ani bir şekilde düşer. Genelde ateşe diğer klinik bulgular da eşlik ederken, nadiren ateş atak sırasındaki tek bulgu olabilir (56). Özellikle çocuk AAA hastalarında 40°C'ye ulaşabilen izole ateş yükseklikleri görülebilir, bu durum özellikle enfeksiyonlarla karışabilir (19).

2.1.5.2. Karın Ağrısı

Tekrarlayan ateşten sonra en sık ikinci bulgu olan karın ağrısı, aseptik serözit zemininde hastaların %90'ından fazlasında ataklara eşlik etmektedir (19). Karın ağrısı sıklıkla lokal olarak başlar, yaygın ağrıya ilerleyebilir. Rebaund, defans, rijidite ve adinamik ileus saptanabilir. Bu bulgular akut batın tablosuyla karıştırılıp, özellikle tanı konmamış hastalar gereksiz cerrahi operasyon geçirebilirler (57). Türkiye'de AAA hastalarının %20'si atak döneminde akut apandisit ön tanısıyla opere edildiği raporlanmıştır (18). Hatta bazı araştırmacılar, klinik tablonun bu denli karışmasından ötürü AAA hastalarında elektif olarak apendektomi yapılması gerektiğine dair fikir beyan etmişlerdir (54). Çocuk hastalarda tabloya ishal eşlik edebilir (58). Ayrıca AAA hastalarında kullanılan kolşisin molekülü de hastaların %10-20'sinde karın ağrısı ve ishale sebep olabilir (59).

Ataklar sırasında bazı hastalarda peritonda hiperemi veya sıvı birikimi gösterilmiştir. Peritonda biriken sıvı ekzudatif karakterde olup, fibrin ve polimorfonükleer lökositlerden zengindir. Bunun yanında asemptomatik dönemlerde bilgisayarlı tomografi görüntülemelerinde, peritoneal sıvı saptanamamaktadır (60). Zaman içerisinde tekrarlayan ekzudatif sıvı birikimleri peritonda yapışıklıklara sebep olarak, mekanik bağırsak obstrüksiyonu, sigmoid volvulus ve strangülasyon gibi komplikasyonlara yol açabilir (19). Özellikle peritoneal sıvıdaki nötrofil oranı ile yapışıklık gelişme riski doğru orantılıdır (61). Yapılan çalışmalar da mekanik bağırsak obstrüksiyonu prevelansının AAA hastalarında normal popülasyondan daha yüksek olduğunu göstermektedir (62). Cerrahi öyküsü olmayan AAA hastalarında intestinal obstrüksiyon sıklığı %3 olarak raporlanmıştır. Tekrarlayan ataklar sonucunda bazı hastalarda sklerozan peritonit zemininde asit gelişimi de görülebilir (54).

2.1.5.3. Göğüs Ağrısı

Ataklar sırasındaki plevra tutulumunun sıklığı ortalama %45 civarında olmakla birlikte, AAA'nın görüldüğü toplumlar arasında farklılık göstermektedir. Ağrı plevranın inflamasyonu sonucunda veya subdiafragmatik inflamasyon

zemininde ortaya çıkabilir (63). Plevra inflamasyonu genellikle tek taraflı olup soluk alıp verme ile ağrı mevcuttur. Göğüs ağrısı, diğer atak bulgularından farklı olarak yedi güne kadar uzayabilir ve nadiren akciğer grafisinde plevral efüzyon tespit edilebilir (59). Homozigot M694V mutasyonu tespit edilen hastalarda, diğer mutasyonlara göre daha sık plevra tutulumu bildirilmiştir (64).

Hastalarda göğüs ağrısı perikardit zemininde de gelişebilir. (65, 66). Hastaların %0,5'inde perikardit raporlanmıştır (67). Perikardite bağlı olarak retrosternal ağrı, elektrokardiyografide ST elevasyonu, ekokardiyografide perikardial efüzyon bulguları ve/veya telekardiyogramda kalp gölgesinde genişleme görülebilir (66). Nadiren, uzamış perikardit atakları sonucunda perikardiyal tamponad ve konstriktif perikardit gibi komplikasyonlar görülebilir (65).

2.1.5.4. Artralji/Artrit

Eklem tutulumu, AAA hastalarının %70'inde artralji %30'unda ise artrit tablosu ile ortaya çıkarken, hastaların yaklaşık %75'inde görülen yaygın bir bulgudur (68). Daha çok monoartrit tablosu görülmekle beraber, genellikle diz ve dirsek eklemleri etkilenmektedir (69). Bunlara ek olarak temporomandibular ve sternoklavikular eklemler de etkilenebilir (19, 70). Hastalarda genellikle aynı eklem tutulması beklenir; fakat bazı hastalarda her seferinde farklı bir eklem tutulabilir (migratuar poliartrit). Bazı olgularda artrit atakların tek bulgusu olabilir (71, 72). Hastaların %16'sında ise atak sırasında ilk semptom olarak ortaya çıkar (25). Artrit bulguları hastaların yaklaşık %50'sinde 10 yaşından önce başlangıç gösterir (3). Buradan hareketle artrit ve artralji bulgularının erken başlangıçlı olgularda daha sık görüldüğü söylenebilir (18). Hastaların artrosentez mayisi incelendiğinde, polimorfonükleer lökositlerden zengin, protein düzeyinin yüksek ve kültürün steril olduğu görülür (73). Lökosit oranının yüksek olduğu olgular septik artrit ile karıştırılabilir (69). Akut atak sırasında direk grafilerde kemik yapılarında herhangi bir değişiklik bulunmaz (74). Artrit bölgesinde genellikle kızarıklık saptanır (75). Artritli AAA hastalarının %40'ında bulgulara erezipel benzeri eritem eşlik eder (76).

Bazı hastalar özellikle alt ve üst ekstremiteleri içine alan yaygın artraljiden yakınır. Haftalar veya aylar sonra ağrı ve inflamasyon kendiliğinden azalır. Bu hastalarda genellikle ikinci bir eklemden de sinovit vardır ve eklem çevresi kaslarda belirgin atrofi ve radyolojide osteoporoz, litik erozyonlar veya osteonekroz görülür. Uzamış artritlerin bazılarında özellikle kalçada görülenlerin %30'unda eklem hasarı ciddi boyutlara ulaşır ağır deformasyonlara yol açabilir. Kalça eklemine sık aspirasyonu ile osteonekroz ve cerrahi müdahale ihtiyacı ortadan kaldırılabilir (70). Kronik diz efüzyonu olan hastalara da kimyasal veya cerrahi olarak sinoviyektomi uygulanması gerekebilir. İleri eklem hasarı olan hastalarda artroplastik endikedir (68, 70).

Hastalarda eklem tutulumunun daha nadir bir tipi HLA-B27'nin negatif olduğu spondiloartropatidir. Bu hastalarda sıklıkla unilateral veya bilateral sakroileit, tekrarlayan entezit ve radyolojide spinal tutulumun görüldüğü lumbalji ve servikalji görülür. Spondiloartropati kolşisin tedavisine yanıt vermezken, nonsteroid antiinflatuarlara ve ikinci basamak antiromatizmal ilaçlara duyarlıdır (77).

2.1.5.5. Miyalji

AAA atakları sırasında hastaların yaklaşık %20-40'ında çeşitli kas bulguları olabilir (18, 78). Ataklar sırasında görülebilen miyaljiler; egzersiz sonrası gelişen çocukluk çağı miyaljisi, fibromiyaljiye bağlı yaygın miyalji, uzamış ateşe bağlı miyalji, atağa eşlik eden miyalji ve kolşisine bağlı gelişen miyalji olmak üzere beş tipte incelenir. Egzersiz sonrası gelişen miyalji genellikle alt ekstremiteleri tutar. Bu tip ateşe veya akut faz yanıtına bağlı değildir, 2-3 gün içerisinde gerileme olur, şiddetli bir atağı takip edebilir ve genellikle akşamları olur (54). Çocuk ve yetişkin AAA hastalarında, fibromiyalji sendromunun insidansı yüksektir. Bu durumun temel sebebi kronik hastalık sebebiyle ağrı eşiğinin düşmesi olarak gösterilmektedir. Hastalarda fibromiyalji temelinde gelişen miyaljide akut faz reaktanlarında ve kas enzimlerinde yükselme beklenmez (79, 80). Atağa eşlik eden miyalji de jeneralize tarzda olmakla beraber, atağın sonlanmasıyla sona ermektedir (53).

Kolşisine bağlı gelişen miyaljilerde ise renal amiloidozise bağlı renal yetmezlik ve buna bağlı olarak siklosporin kullanımı primer predispozan faktördür. Bu tip miyaljide proksimal kas güçsüzlüğüne ek olarak, kas enzimlerinin düzeylerinde artış, elektromyografide miyopatik patern ve kas biyopsisinde non-nekrotik kas fibrillerinde otofajik vaküller ve lizozomal depolanma tespit edilebilir (81). Uzamış ateşe bağlı miyalji vakalarının yaklaşık %1-3 civarında görülür (78, 82). Özellikle alt ekstremitelerde ortaya çıkar, ve hastaların yaşam kalitesini etkileyecek düzeyde şiddetli ağrı-hassasiyet ile altı haftaya kadar devam eder. Serözit ataklarından önce veya sonra görülebilir, %70'ine ateş eşlik eder (83). Kas enzimi düzeyleri, kas biyopsisi ve EMG elektromyelografi normaldir; fakat MR görüntülemesinde kaslarda ödem tespit edilebilir (54). Bu durum M694V homozigot mutasyonlu hastalarda daha siktir (84).

2.1.5.6. Cilt Bulguları

Ataklar sırasında çeşitli cilt lezyonları gelişebilir. Hastalık ile ilişkili primer cilt bulguları olarak ürtiker, avuç içleri ve tabanlarda diffüz eritem, subkutan nodüller, anjionörotik ödem, piyoderma, Raynaud fenomeni, vaskülitlere bağlı cilt bulguları ve anlamlısı olarak erezipel benzeri eritem görülebilir (85). Erezipel benzeri eritem AAA açısından en spesifik cilt bulgusu olup, ateş ve/veya artrite eşlik eder; bacak, ayak bileği ve ayak sırtında yerleşik olabilir (Şekil 6). Uzun süreli yürüme ve ayakta durmalarda şiddetlenebilir (85). Lezyon 15-50 cm ebatlarında, ağrılı, lokal ateşli, kabarık ve keskin sınırlı olup 1-3 günde kaybolur (19). Sıklıkla tek taraflıdır; fakat bazen iki ekstremitayı de tutabilir. Histopatolojik incelemede lezyonlarda herhangi bir spesifik anomali saptanamamıştır (85).



Şekil 6. Erezipel benzeri eritem (86).

2.1.5.7. Diğer Klinik Bulgular

Tunika vajinalisin inflamasyonu sonucu peritonun genişlemesi akut skrotal ataklara sebep olabilir. Bu bulgu daha çok çocuklarda ve genç erişkinlerde görülür. Genellikle tek taraflıdır ve kızarıklık, ağrı, ödem gibi inflamasyon bulguları eşlik edebilir (54). Çeşitli sinir sistemi bulguları ataklara eşlik edebilir; fakat bu bulguların çok nadir olduğu belirtilmiştir.

Multipl skleroz prevalansının AAA hastalarında normal toplumdan 2-4 kat daha yüksek olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (87, 88). Göz tutulumu çok nadirdir. Vaka raporu düzeyinde sklerit, pre-üveit, pan-üveit, papillit ve retinal kolloide benzer vakalar raporlanmıştır (89-91).

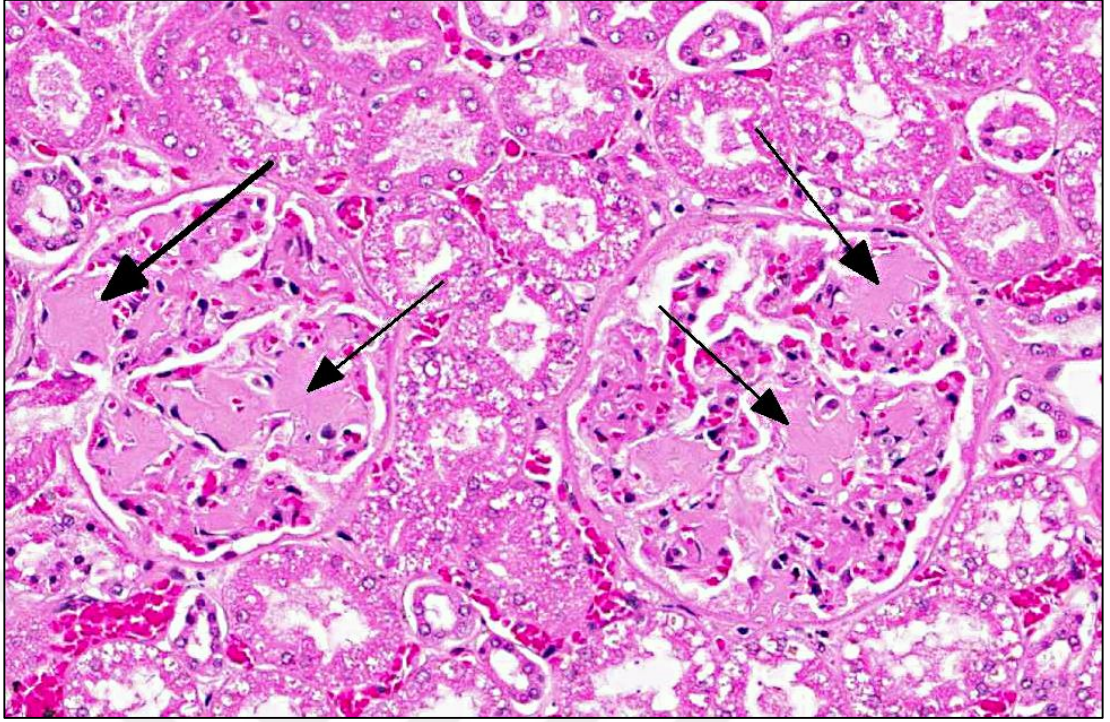
2.1.5.8. Amiloidozis

Hastalığın prognozunu belirlemede en önemli faktör amiloidozis ve son dönem böbrek yetmezliği gelişimidir. Bu komplikasyon en sık Sefardik

Yahudilerinde görülür ve vakaların %60'ını oluşturur. Amiloidoz gelişiminde en önemli faktör, karaciğerde üretilen serum amyloid A proteininin artışıdır (Şekil 7) (92). Bu insolubl proteininin artmış sentezi ve azalmış eliminasyonu, ekstraselüler alanlarda birikim zemininde amiloidozis gelişimine sebep olabilir (93). Kolşisin kullanmamış 40 yaş altı AAA hastaların %60-75'inde amiloidoz gelişebilir (94). Kolşisin kullanımı amiloidozis insidansını belirgin şekilde azaltmaktadır; fakat AAA'nın yaygın olduğu toplumlarda amiloidozis önemli bir komplikasyondur.

Türkiye'de yapılan iki çalışmada AAA'lı hastalarda amiloidozis oranları %12.9 ve %8.6 olarak bulunmuştur (18, 95). AAA'nın sık görüldüğü toplumlarda amiloidozis oranı çevresel ve genetik etkenlere bağlı olarak değişmektedir. Bu sebeple aynı topluma ait, fakat farklı coğrafyalarda yaşayan bireylerde dahi amiloidozis insidansı farklıdır. Birçok yayın amiloidozis gelişimindeki en önemli risk faktörünün MEFV genindeki M694V homozigot mutasyonu olduğunu belirtmiştir (95, 96). Daha önce 2246 Türk hastada yapılan bir çalışmada M694V homozigot mutasyonlu bireylerin altı kat daha fazla risk altında olduğu belirtilmiştir (96). Ayrıca erkek cinsiyette olmak ve amiloidozis açısından pozitif aile öyküsü de risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (95, 97).

Amiloid artıkları ilk olarak dalak, karaciğer ve böbreklerde birikmeye başlar, sonrasında da testisler, adrenal bezler, gastrointestinal sistem ve sinir sisteminde de birikim görülebilir (92). Amiloid fibrilleri sebebiyle oluşan böbrek hasarı zemininde böbrek yetmezliği ve nefrotik sendrom en sık görülen klinik sonuçlardır. Gastrointestinal birikiminde birçok hasta asemptomatik olmasına rağmen, bazılarında ishal ve malabsorbsiyon görülebilir. Testislerde amiloid birikimi ise azospermi ve infertiliteye sebep olabilir. Dolaşım bozukluğu ve kalp yetmezliği olan hastalarda da kardiyak birikim göz önünde bulundurulmalıdır (19).



Şekil 7. Renal amiloidozisin ışık mikroskopunda hematoksilen eozin boyama ile elde edilmiş görüntüsü (98)

Hastalar renal amiloidozis için rutin idrar testleriyle takip edilmelidir. Tanı için en sensitif yöntem renal biyopsidir (%88); fakat amiloidozise bağlı kanama eğilimi artışı biyopsiyi sınırlamaktadır. Bu sebeple daha az sensitif olmasına rağmen daha az invaziv olduğu için rektal biyopsi tercih edilebilir (%75). Kemik iliği biyopsisi ve yağ doku biyopsisi de alternatif olarak kullanılabilir. Kemik iliği biyopsisinin sensitivitesi renal biyopsinin sensitivitesine yakın olsa da, yağ doku biyopsisinin sensitivitesi düşüktür (99-101). Amiloidozisle ilgili klinik bulgular genellikle 40 yaş üstünde görülür.

2.1.5.9. AAA'ya Eşlik Eden Vaskülitler

Yapılan çalışmalar, poliarteritis nodosa (PAN) ve Henoch-Schönlein purpurasının (HSP) AAA hastalarında normal topluma göre daha sık görüldüğünü göstermiştir. Daha düşük oranda Behçet hastalığı da AAA'ya eşlik edebilir.

Poliarteritis nodosa küçük-orta çaplı arterleri tutan ve nekrotizan inflamasyona sebep olan bir vaskülitir. Ailevi Akdeniz ateşi ve PAN birlikteliği vakaların %0.9'unda raporlanmıştır. Bu vaskülitin toplumdaki prevalansının 6/100000 olduğu göz önünde bulundurulduğunda, AAA hastalarında PAN görülme riskinin 200 kat daha fazla olduğu görülecektir (18, 102). Bu birliktelikte hastalarda AAA klinik bulguları PAN klinik bulgularından daha önce kendini gösterir (102). Semptomlar açısından, iki hastalık da karın ağrısı, ateş, miyalji, eklem ve cilt bulguları gibi benzerliklere sahiptir (53); fakat AAA'ya eşlik eden PAN ile klasik PAN arasında klinik açıdan bazı farklılıklar vardır. Klasik PAN 40-60 yaşları arasında klinik gösterirken, AAA ilişkili PAN daha genç yaşlarda ortaya çıkar (102). Yapılan bir çalışmada AAA ilişkili PAN'ın ortalama görülme yaşının 14.9 yaş olduğu raporlanmıştır (103). Ayrıca klasik PAN erkeklerde daha sık görülürken, AAA ilişkili PAN'da kadın erkek oranı eşittir (18). Klasik PAN'da spontan perirenal hematoma nadirken, AAA ilişkili PAN olgularının yarısında görülür (103). Klasik PAN'da glomerüler tutulum görülmezken, AAA ilişkili PAN'da glomerüler tutulum sıklıdır (104, 105). Prognoz açısından da, AAA ilişkili PAN daha düşük mortaliteye sahiptir (103).

Henoch-Schönlein purpurası cilt, böbrek, eklem ve gastrointestinal tutulumu olan ve küçük arterleri tutan, çocukluk çağının en sık görülen vaskülitidir. Vaka serilerinde AAA ve HSP birlikteliği %2.7-7.2 arasında gösterilmiştir (105). Henoch-Schönlein purpurasının çocukluk dönemindeki insidansının %0.8 olması sebebiyle, AAA hastalarında dört kat risk artışı olduğu söylenebilir. Klasik HSP ile AAA ilişkili HSP arasında klinik açıdan önemli bir fark gösterilememiştir (102).

Behçet hastalığı Akdeniz bölgesi ile Uzakdoğu arasındaki toplumlarda sık olarak görülen bir idiyopatik inflamatuvar hastalıktır (106). Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında Behçet hastalığı insidansının arttığına dair çalışmalar olsa da aksini belirten çalışmalar da mevcuttur. Klinik açıdan da klasik Behçet hastaları ve AAA ilişkili Behçet hastaları arasında önemli bir fark bulunamamıştır (102).

2.1.6. Laboratuvar Bulguları

Şu ana kadar AAA ile direkt ilişkili bir laboratuvar parametresi gösterilememiştir. Eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein (CRP) ve serum amiloid-A gibi akut faz reaktanları ataklar sırasında yükselirler. Ayrıca bunlara fibrinojen ve lökosit seviyelerindeki artışlar da eşlik eder. Bir negatif akut faz reaktanı olan albümin ise ataklar sırasında genellikle sabit kalır. Aynı şekilde platelet değerlerinde de atak sırasında önemli bir değişiklik olmaz. Bazı durumlarda atak öncesi dönemde de akut faz reaktanları yükselebilir. Bazı araştırmalar, hastaların yarısında sub-klinik dönemde CRP değerinin arttığını belirtmişlerdir (107, 108). Buna ek olarak, amiloidozis ile ilişkili olan serum amiloid-A düzeyi, hastaların yaklaşık %30'unda ataklar arası dönemde de yüksek değerlerdedir (108). Ayrıca ilginç bir şekilde MEFV mutasyonu taşıyan sağlıklı bireylerde de MEFV mutasyonu taşımayan sağlıklı bireylere göre akut faz reaktanlarının düzeyinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum, bu hastalarda hasarlı pyrin proteininin sitokin yolağını aktifleyerek akut faz yanıtını aktiflemesiyle açıklanmıştır (109). Sitokin düzeyleri üzerine yapılan çalışmalarda, özellikle hepatositlerden akut faz reaktanlarının üretimini indükleyen IL-6 düzeyinin ataklar sırasında arttığı gösterilmiştir (110). Hastalık patogenezinde önemli bir rolü olan IL-1 düzeyi farklı araştırmacılar tarafından araştırılmış olsa da mevcut yöntemlerle AAA atakları ile ilişkisi gösterilememiştir (111). Otoantikorlar üzerine yapılan çalışmalarda ise romatoid faktör, anti-nükleer antikor düzeyleri ile AAA arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (112, 113).

Daha önce yapılan vaka sunumlarında AAA ataklarında bilirubin seviyesinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu hipotez daha sonra vaka-kontrol çalışmaları ile de desteklenerek, AAA hastalarının yaklaşık %25'inde atak sırasında direkt ve indirekt bilirubin seviyeleri yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada ataklar sırasında transaminaz düzeylerinin de sabit kaldığı belirtilmiştir (114). İdrar tetkiklerinde, atak ve atak öncesi dönemde transient hematüri ve proteinüri görülebilmektedir (107). Hastaların yaklaşık yarısında dışkıda gizli kan tespit edilmiş olup, bu durumun ataklar sırasında vasküler permabilite artışına bağlı olabileceği belirtilmiştir (105).

2.1.7. Tedavi

Tedavi hedefleri; atakları tedavi etmek, atakları engellemek, ataklar arası dönemde inflamasyonu baskılamak, amiloidozis gelişimini önlemek olarak sıralanabilir.

Kolşisin 1970'lerden beri AAA tedavisinde kullanılan tek alternatif moleküldür. Kolşisinin atakları azalttığı yapılan randomize kontrollü çalışmalarda ispatlanmıştır (115, 116). Kolşisinin optimal dozu hakkında henüz bir fikir birliği sağlanamamıştır. Yetişkin hastalar için standart doz 1 mg olmasına rağmen, atak gelişiminde doz 1.5-2 mg'a yükseltilebilir. Günlük total doz yan etkileri azaltmak için bölünerek verilebilir (117). Çocuk hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, düzenli kolşisin kullanımında hastaların üçte ikisinde komplet remisyon, üçte birinde ise parsiyel remisyon sağlanmıştır. Kolşisine direnç vakaların yalnızca %5'inde tespit edilmiştir (118, 119). Yapılan diğer çalışmalarda hastalar arasında kolşisin direnci %5-10 arasında gösterilmiştir (120). Düzenli olarak kolşisin kullanımı sonucunda da amiloidozis komplikasyonları engellenmektedir (121). Amiloidozis gelişmiş fakat son dönem böbrek yetmezliğine gitmemiş hastalarda da günlük 1.5 mg veya üzerinde kolşisin kullanımının, renal hasar gelişimini durdurduğu ve proteinüri düzeyini azalttığı raporlanmıştır (122, 123). Amiloidozis sonucunda son dönem böbrek hasarı gelişmiş ve renal transplantasyon uygulanmış hastalarda kolşisin dozu eğer hasta tolere edebiliyorsa semptomlardan bağımsız olarak günlük 2 mg olmalıdır (117). Glomerüler filtrasyon hızının 10 mL/dk değerinin altına düştüğü son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda ise kolşisin toksisitesinden korunmak için doz yarıya düşürülmelidir (117). Kolşisin direnci gelişiminde en önemli faktör, ilaç kullanımının aksatılması veya düzensiz kullanılmasıdır (1). Kolşisin atak sayısını azaltmada etkili olmasa bile, amiloidozisi engelleme etkisi sebebiyle kesinlikle bırakılmamalıdır.

Tedavi protokolünde kolşisine ek olarak, yatak istirahati, parasetamol ve non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar önerilir. Atak sırasında, rutinde kullanılan kolşisin dozunu arttırmanın ekstra bir koruyuculuğu olmamakla birlikte aksine ishal ve daha ileri gastrointestinal komplikasyonlara yol açma riski vardır (117).

Birçok çalışmada, ataklar sırasında kullanılabilecek alternatif terapiler denenmiştir. Atak başlangıcında IV olarak 40 mg metilprednizolon veya interferon alfa uygulamasının semptomları azaltmada etkili olabileceği önerilmiştir (17, 124). Bazı çalışmalar, kolşisine dirençli vakalarda IL-1'i bloke eden ajanların atakların tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir (125). Özellikle IL-1 α and IL-1 β reseptörleri üzerinden antagonist etki yapan anakinra ve IL-1 β monoklonal antikoru sanakinumab molekülleri atakların sayısını ve şiddetini azaltmaktadır (125, 126). Bir IL-1 inhibitörü olan rilonacept molekülü ile yapılan randomize kontrollü çalışmalar da, bu molekülün atak sıklığını azalttığını göstermiştir (127). Son çalışmalarda anti tümör nekrozis faktör (TNF) ajan olan talidomidin de atak sıklığını azalttığını göstermiştir (128).

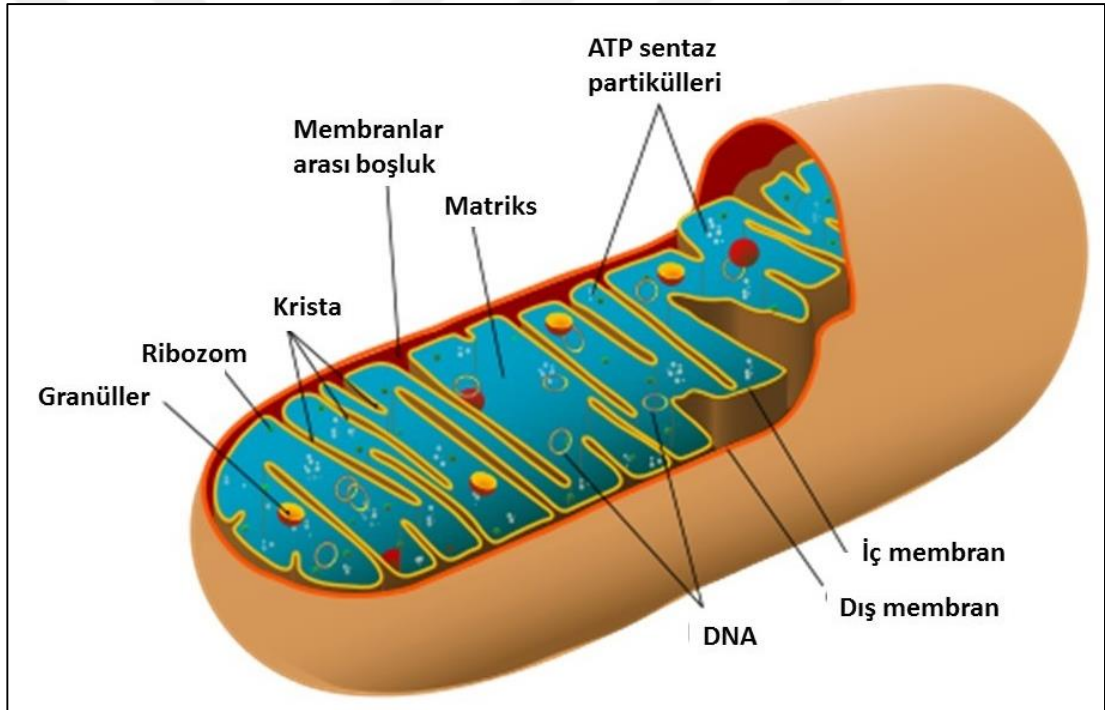
2.1.8. Prognoz

Hastalığın prognozunu belirleyen en önemli özellik amiloidozis varlığıdır. Amiloidozis gelişme sıklığı toplumlar ve ırklar arasında farklılık göstermekte olup ülkemizde yapılan bir çalışmada %12,9 olarak saptanmıştır (18). Ancak erken teşhis ve erken başlanan kolşisin tedavisiyle bu oran %1'ler seviyesine inmektedir.

2.2. Mitokondri

Mitokondri oksidatif fosforilasyonla ATP üretimini sağlayan, hücresel enerjinin kaynağı sayılan organeldir (129). Yağ asidi β -oksidasyonu, trikarboksilik asit döngüsü (Krebs döngüsü), üre siklusu, aminoasit, kolesterol, yağ, steroid ve nükleotidlerin metabolizması gibi temel metabolik olaylar da mitokondride gerçekleşir (130). Mitokondri ayrıca apoptozda ve hücre bölünmesinde görev yapan sinyal transdüksiyon yolağında da görev yapmaktadır (131). Mitokondrinin diğer organellerden farklı olarak, kendine ait genomu vardır. Mitokondri insanda olgun eritrositler dışında tüm ökaryotik hücrelerde bulunurlar. Uzunluğu 1-7 mikrometre, çubuk şeklinde veya 2-3 mikrometre çapında küresel yapılardır. Kabaca dış membran, iç membran, krista, matriks ve membranlar arası boşluktan oluşmaktadır (Şekil 8). Mitokondri dış membranı porin adı verilen kanal proteinleri içerir; bu proteinler 5000 dalton ve daha küçük moleküllerin, iyon ve metabolitlerin serbest

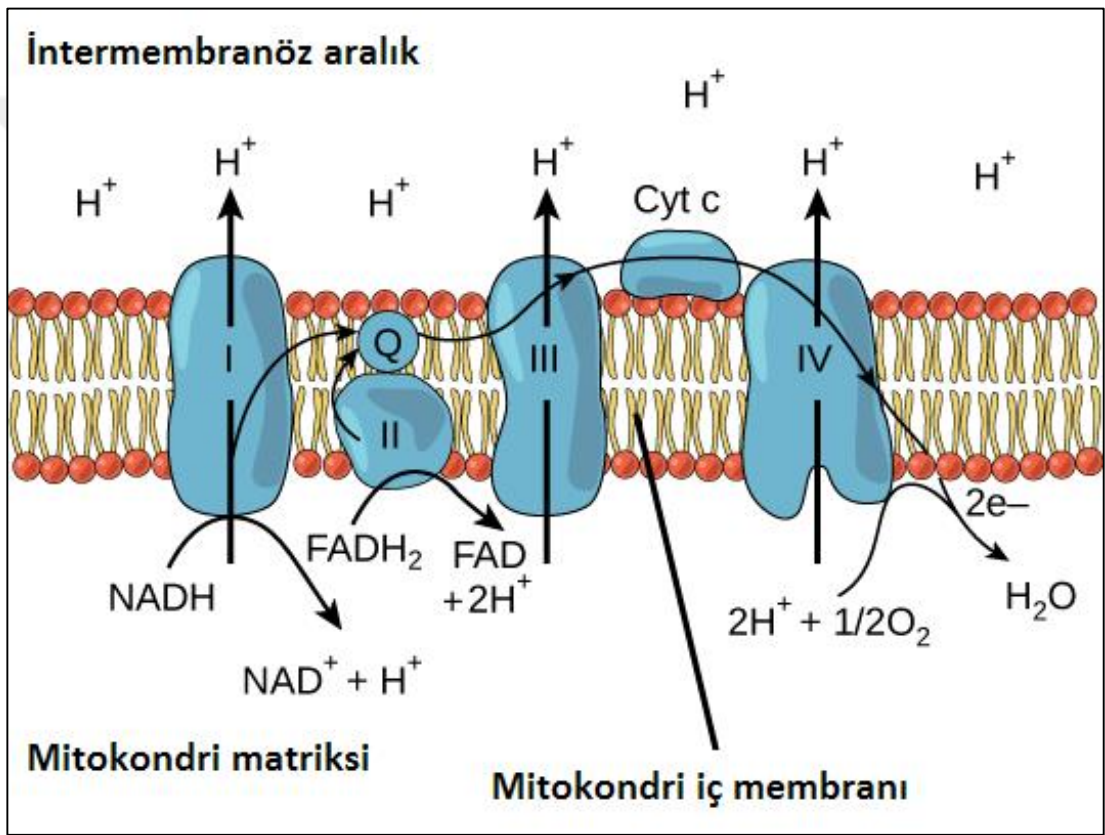
difüzyonunu sağlar. Çekirdek genomu tarafından üretilen proteinler mitokondri dış membranından TOM/TIM protein kompleksi üzerinden geçerler. Mitokondri iç membranı krista olarak tanımlanan katlantılar sayesinde yüzey alanını artırır. İç membran seçici geçirgen yapıda olup, protein ve metabolitlerin matrikse taşınması için spesifik mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalar genellikle taşıyıcı protein yapılarından oluşmaktadır. Büyük moleküller ATP bağımlı aktif transport yoluyla matrikse alınırlar (132). Mitokondri matriksi ve sitozol arasında devamlı bir madde alış verışı olur. Mitokondri iç membranının lipid yapısı kardiyolipin fosfolipidi açısından zengindir.



Şekil 8. Mitokondrinin yapısı

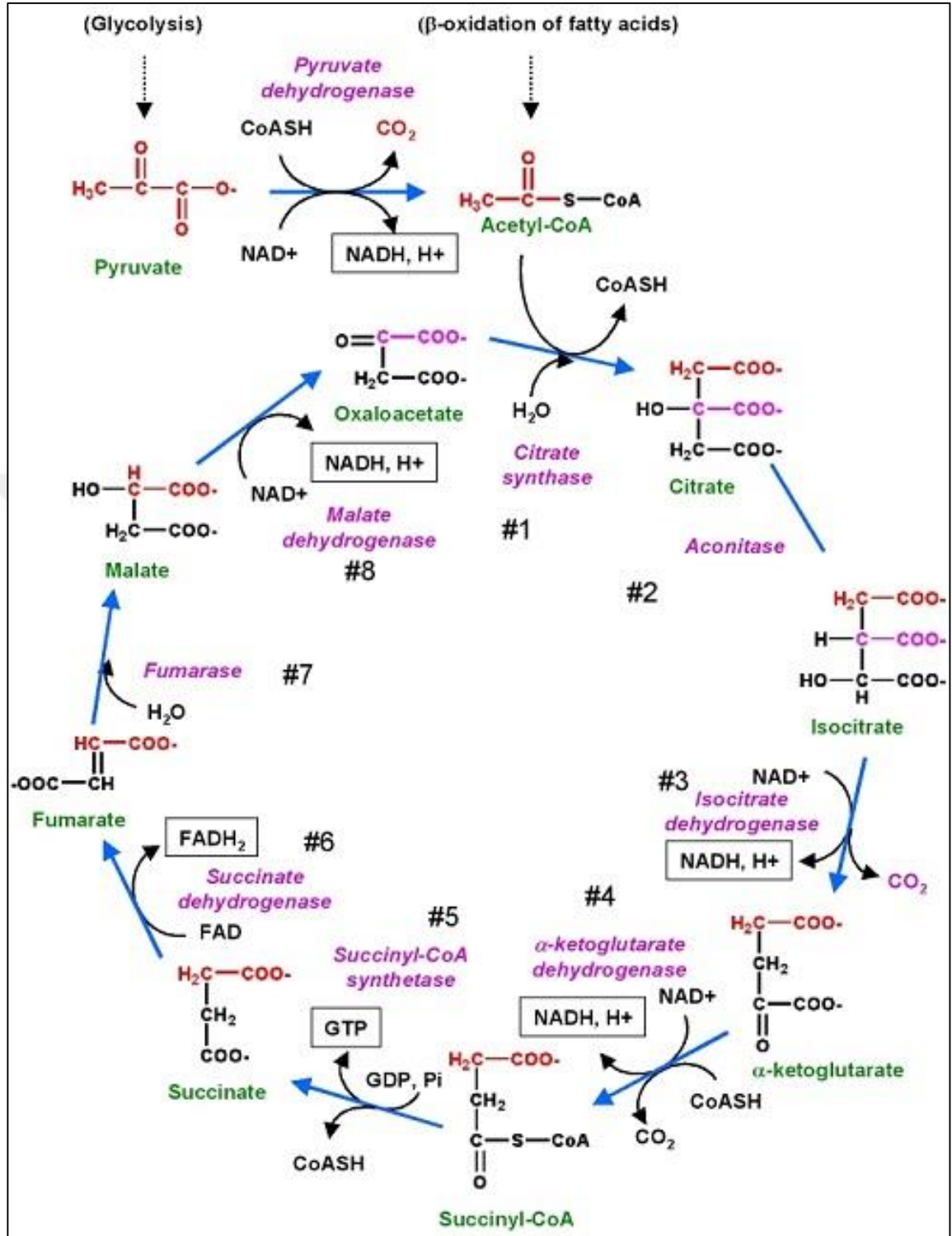
İnsan hücrelerinde farklı sayıda mitokondri bulunmaktadır. Bu sayı 1000-100000 arasında değişebilmekte ve dokular arasında farklılık göstermektedir (133). Sinir hücreleri, iskelet kas hücreleri ve kalp kas hücreleri gibi yüksek enerjiye ihtiyacı olan dokularda daha fazla sayıda mitokondri mevcuttur. Bu sebeple

mitokondri sayısı ve mitokondrideki kristalların yoğunluğu hücrenin metabolik aktivitesi ile doğru orantılıdır. Mitokondriler hücre içinde mikrotübüller üzerinden hareket ederler ve enerji ihtiyacı olan bölgeye yerleşirler. Enerji üretiminde son basamak olan elektron transport zinciri mekanizması mitokondri iç membranında yer almaktadır (Şekil 9). Bu mekanizma beş enzim kompleksinden oluşmaktadır ve her bir kompleks birçok alt-ünite içermektedir.



Şekil 9. Elektron transport zinciri mekanizması (133)

Mitokondri matriksi içinde piruvat, aminoasit ve yağ asitlerinin metabolizması sonucunda ortaya çıkan asetil koenzim A, Krebs siklusuna girerek oksidasyona uğrar (Şekil 10). Bu sıklusta karbondioksit, indirgenmiş flavin adenin dinükleotit (FADH₂) ve nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) oluşur (134).



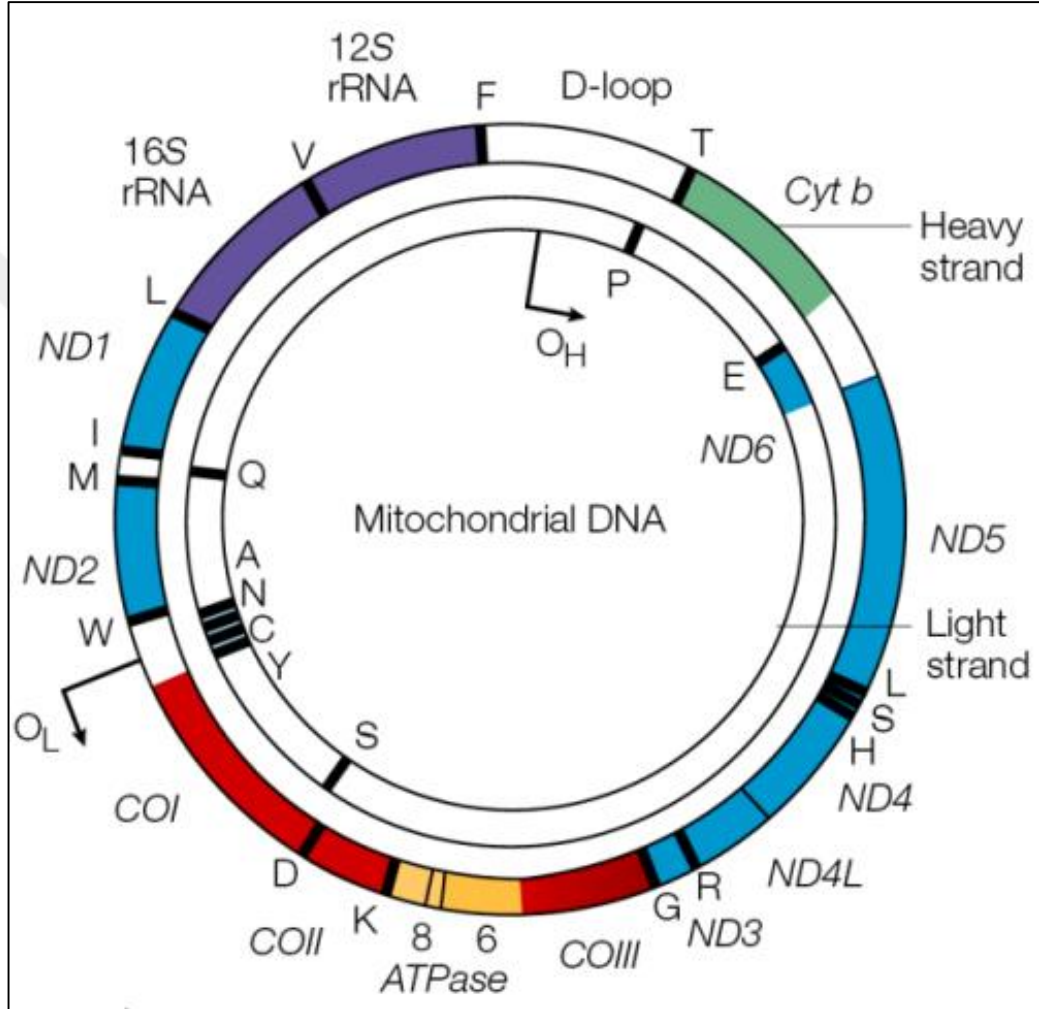
Şekil 10. Krebs siklusu mekanizması (135)

Yüksek enerjili elektronlar FADH_2 ve NADH ile taşınarak mitokondri iç membranında bulunan proteinler aracılığıyla O_2 'ye ulaştırılır ve H_2O oluşur. Karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması sırasında oluşan NADH ve FADH_2 mitokondrinin iç membranında yer alan kompleks I ve kompleks II'ye elektron sağlarlar. Respiratuar zincirdeki enzim komplekslerinin alt-üniteleri hem çekirdek DNA'sı (nDNA) hem de mtDNA tarafından kodlanmaktadır. Kompleks I yedi tanesi mtDNA tarafından kodlanan toplam 45 alt-üniteden oluşmaktadır. Kompleks II ise dört alt-üniteden oluşmaktadır ve tümü nDNA tarafından kodlanmaktadır. Bu kompleks süksinatın fumarata oksidasyonunda katalizör görevi görür. Elektrokimyasal fark doğrultusunda ve iki hareketli elektron taşıyıcı olan ubikinon ve sitokrom c ile elektronlar kompleks III ve kompleks IV'e ulaştırılır. Kompleks III ubikinondan sitokrom c'ye elektron transferini sağlar. Kompleks III'ü oluşturan 11 alt-üniteden, sadece sitokrom b nDNA tarafından kodlanırken, diğerleri mtDNA tarafından kodlanırlar. Kompleks IV elektron transport zincirinin son parçası olup, sitokrom c'nin O_2 'yi indirgemesinde katalizör görevi görür. Kompleks IV 13 alt-üniteden oluşur ve bunların 10 tanesi nDNA tarafından, üç tanesi de mtDNA tarafından kodlanmaktadır. Kompleks V (ATP sentetaz) ise 16 alt-üniteden oluşur ve ikisi mtDNA tarafından kodlanırken 14 tanesi nDNA tarafından kodlanır. Elektron transportundan sağlanan enerji kompleks I, kompleks III ve kompleks IV tarafından mitokondri matriksinden membranlar arası boşluğa proton (H^+) pompalamak için kullanılır. Matriksteki protonlar intermembranöz aralığa gönderilir ve sonuçta proton gradienti oluşur. İntermembranöz aralıkta toplanan protonlar, kompleks V (ATP sentetaz) tarafından matrikse geçirilirken ATP açığa çıkar. Bu olay oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır. Oluşan ATP, sitozolde bulunan ADP ile adenin nükleotid translokator yardımıyla değiştirilir. Sonrasında ATP sitozolde enerji gerektiren işlemlerde kullanılır (136-138).

2.2.1. Mitokondriyal DNA

İnsan mitokondri genomu 16569 baz uzunluğunda, sirküler ve çift zincirli bir yapıdan oluşmaktadır (129). İki zincirden biri hafif zincir biri de ağır zincir olarak tanımlanır ve sezyum klorid gradyentlerinin dansitelerine göre ayırt edilir (Şekil 11). Mitokondri genomundaki 13 gen oksidatif fosforilasyon mekanizmasından sorumlu

polipeptitleri üretirken, 2 gen rRNA, 22 gen de tRNA üretiminden sorumludur. Kodlanmayan bölge (displacement loop), yaklaşık 1100 baz uzunluğunda, gen içermeyen ve ileri derecede polimorfizm gösteren, ağır zincirin replikasyonundan sorumlu bölgedir. Diğer mitokondriyal proteinler çekirdek DNA'sından kodlanır, sitoplazmada sentezlenerek mitokondriye alınır (139).



Şekil 11. Mitokondriyal DNA'nın yapısı (135).

Mitokondriyal kalıtım, Mendelyen kalıtım paternine göre farklılıklar göstermektedir. Bunlardan en önemlisi mtDNA'nın maternal kalıtım göstermesidir. Spermin sitoplazma içermemesi ve mitokondrilerin fertilizasyona katılmayan kuyruk kısmında toplanması nedeniyle zigottaki mitokondriler sadece ovuma aittir. Anne

tüm çocuklarına mtDNA'sını aktarırken, sadece kız çocuklar bunu ikinci kusağa aktarır (140, 141). İkincisi ise mtDNA'nın poliploid yapı göstermesidir, yani bir hücrede binlerce mtDNA kopyası bulunabilmektedir. Ayrıca, replikasyon ve transkripsiyon mekanizmaları mitokondride beraber yürümektedir. Mitokondriyal genom ve çekirdek genomu farklı selüler kompartımanlarda gerçekleşmektedir; fakat her iki mekanizma da mitokondrinin normal işleyişi için fonksiyon göstermektedir (142).

Poliploidi zemininde mitokondri genomunda homoplazmi ve heteroplazmi gözlenir. Homoplazmi, mitokondri kopyalarının birbirleriyle aynı dizilimde olması; heteroplazmi ise mitokondri kopyalarının birden fazla çeşitlilikte dizi yapısı içermesidir. Özellikle mitokondriyal hastalıklar için mtDNA ile yapılan analizlerde heteroplazmi oranı, hastalığın ortaya çıkması açısından önemlidir. Mitokondriyal genomdaki delesyonlar için eşik değerin yaklaşık %60, tRNA mutasyonları için ise %90'ın üzerinde olduğuna inanılmaktadır (143, 144). İskelet kası, sinir, kalp ve karaciğer için heteroplazmi eşik değeri düşüktür. Mutant DNA yüzdesi ile hastalığın şiddeti arasında da bir korelasyon mevcuttur (145). Heteroplazmi düzeyindeki değişikliğe göre belirtilerin başlangıç zamanı, ilerleyici seyir göstermesi ve de hastalık şiddeti değişmektedir (137, 141, 146).

Mitokondriyal genom polimorfiktir, yani aynı etnik gruptaki bireyler arasında dahi mtDNA diziliminde farklılıklar mevcuttur (141, 147). Ayrıca fonksiyon bozukluğu potansiyeli çekirdek DNA'sından daha fazladır. Mutasyonlar çekirdek DNA'sına göre 7-10 kat daha fazla görülür ve yaşlanmayla bu mutasyonlar artar (148). Mutasyonun fazla görülmesinin nedenleri arasında; mtDNA'nın koruyucu histonlarının olmaması, ortamda oksijen radikallerinin yoğun olması, ortamda birçok metabolitin mevcut olması, koruyucu ve onarım mekanizmalarının yetersiz olması sayılabilir (149).

Mitokondri genomu mitokondri matriksi içerisinde "Nükleotid" adı verilen özel yapılar şeklinde organize olmuştur. Bu yapı hücre çekirdeğine eşdeğer niteliktedir ve prokaryotlarda da bu yapı bulunmaktadır. Nükleotidler nükleik asitlerin yani sıra mitokondriyal transkripsiyon faktör A (TFAM), mitokondriyal tek

zincir bağlayıcı protein (mtSSBP) ve helikaz gibi protein yapıları da bünyesinde barındırmaktadır (150). Her mitokondrideki nükleotid yapısı dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Nükleotitler mtDNA'nın organize olmasını sağlar ve heteroplazmi oranının belirlenmesinde önemlidir. Her nükleotit 5-7 arasında mtDNA kopyası içerir ve yaklaşık 70 nm çapa sahiptir (151).

2.2.2. Mitokondriyal DNA Replikasyonu

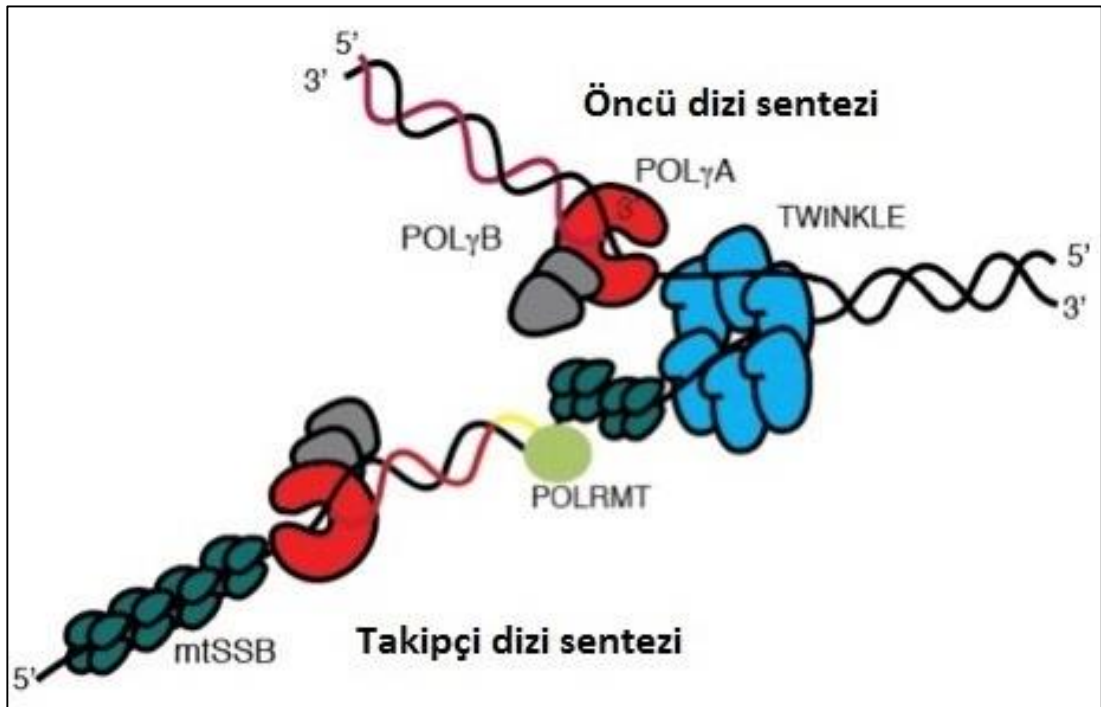
Replikasyon mtDNA'da çekirdek DNA replikasyon mekanizmasından bağımsız olarak gerçekleşmektedir (152). Buna rağmen, mtDNA ile etkileşen faktörlerin bir çoğu çekirdek DNA'sından sentezlenir, ve bu durum çekirdeğin mtDNA kopya sayısının düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bölünemeyen hücrelerde de mitokondriyal replikasyon mevcuttur (153). Mitokondriler hücre bölünmesi sırasında rasgele dağılım gösterir ve mitoz bölünme sırasında yavru hücrelere eşit dağıtılmaz (152, 154). Transkripsiyon ve replikasyon mitokondride birlikte gerçekleştiği için, transkripsiyondan sorumlu proteinler aynı zamanda replikasyonda da görev yapmaktadır (152).

DNA polimeraz γ (POLG) insan mitokondrisinde bulunduğu bilinen tek DNA polimerazdır. Bu enzim heterodimerik kompleks yapıdan oluşmakta olup, 120-140 kDa'luk katalitik ünite ve 35-50 kDa'luk aksesuar subünite içermektedir (155). Aksesuar subünite hem RNA primerine göstermekte hem de çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliği göstermektedir (156, 157). Mitokondriyal genomun replikasyonunun sürdürülmesi ve mtDNA'nın onarımında POLG önemli rol oynamaktadır.

Mitokondriyal tek zincirli DNA bağlayıcı protein (mtSSBP) ve mitokondriyal helikaz enzimi de beraber çalışarak replikasyon sırasında mtDNA'nın stabilizasyonunu sağlar. Mitokondriyal TFAM, nükleotit yapısının esansiyel bir komponenti olup, transkripsiyonun ve replikasyonun başlaması için gereklidir. Ayrıca mitokondriyal genom üzerindeki D-loop bölgesi üzerinden protein bağlayıcı etki gösterir. Total TFAM düzeyinin anlamlı düzeyde mtDNA kopya sayısı ile ilişkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Şekil 12) (158). TFAM

promotor bölgesi Sp1, nükleer respiratuar faktör 1, nükleer respiratuar faktör 2 ve hStaf/ZNF143 proteinleri tarafından düzenlenmektedir (159, 160). Mitokondriyal replikasyonda TFAM'ın rolü tam olarak netleşmemiş olup, daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Mitokondriyal genomun replikasyonunun düzenlenmesi, mitokondri biyogenezinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Peroksizom proliferatör aktifleştirici gama koaktivatör 1 alfa, nükleer hormon reseptör PPAR γ ve tiroid hormon reseptörü ile etkileşmesi sonucunda, nükleer respiratuar faktör 1, nükleer respiratuar faktör 2 ve TFAM'ın ekspresyonlarını arttırarak mitokondri biyogenezinde anahtar rol oynamaktadır (161). Tiroid hormon reseptörleri, mitokondri genomundaki tiroid hormon cevabı elementi dizileri üzerinden mitokondriyal transkripsiyonu ve replikasyonu arttırarak mitokondri biyogenezini düzenler (162). Nitrik oksit de vazodilatör etkisinin yanından mitokondri biyogenezini arttırmaktadır (163). Mitokondriyal biyogenezin, belirtilen anahtar oyuncular ve kontrol mekanizmaları dışında farklı düzenleyici kaskatlarla da etkileşimde olduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 12. Mitokondriyal DNA replikasyon mekanizması (164).

Güncel olarak mtDNA için tanımlanmış iki farklı replikasyon modeli vardır. Asenkronize yer değiştirme mekanizması iki adet tek yönlü, birbirinden bağımsız orijin içerir. Bu modele göre ağır zincir dizisi, hafif zincir dizisinin replikasyon orjinine ulaşana dek sentezlenir ve sonrasında hafif zincir dizisinin sentezlenmesi karşı yönde başlar (164). Bu mekanizmaya alternatif olarak, öncü ve takipçi diziler birleşik şekilde tek yönlü olarak sentezi gerçekleştirmektedir (165). Daha önceki araştırmalar da her iki mekanizmanın da mtDNA replikasyonu sırasında aynı anda görülebildiği ve bu mekanizmalar üzerindeki değişimlerin mtDNA kopya sayısını etkilediğini göstermiştir. Ölçülen mtDNA kopya sayısı, mitokondride bulunan mtDNA molekülünün uzunluğunu değerlendirmektedir. Bu döngüde öncelikle önemli olan mtDNA'nın sentez ve degradasyon hızları hakkında bilgi sahibi olmaktır. İlk olarak 3H-metiltimidin testi ile DNA sentez düzeyi gösterilebilmektedir. Düşük düzeydeki 3H-metiltimidin geri emilimi, azalmış mtDNA döngüsü ve yaşlanma ile orantılıdır (166).

2.2.3. Mitokondriyal DNA Kopya Sayısı Değişikliklerinin AAA ile İlişkisi

İmmün sistem hücreleri savunma mekanizmasını çalıştırmak için yüksek seviyede enerjiye ihtiyaç duyar. Bu sebeple lökosit hücreleri yüksek düzeyde mitokondri içermektedir. Daha önce romatolojik hastalıklar grubundan sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalığında yapılan bir çalışma, mitokondriyal disfonksiyonun bu hastalığın fizyopatolojisinde etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca aynı çalışmada SLE'nin prognozu için önemli bir parametre olan lupus nefritinin de mtDNA kopya sayısı değişiklikleri, mtDNA nokta mutasyonları ve mtDNA heteroplazmi düzeyleri zemininde mitokondriyal disfonksiyonu şiddetiyle doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (13). Fizyopatolojisinde mitokondriyal disfonksiyon olduğu düşünülen birçok hastalık için farklı doku örneklerinde mtDNA kopya sayısı değişiklikleri gösterilmiştir.

2.3. Real-Time PCR

Real-time PCR DNA'nın çoğaltımının floresan işaretli prob ve boyalarla eş zamanlı olarak tespit edildiği ve floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Kinetik PCR, homojen PCR, kantitatif Real-time PCR olarak da isimlendirilmektedir (167). En sık biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını ve mRNA'nın düzeyini kantitatif olarak belirleyebilmek için kullanılmaktadır. Tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi birçok alanda kullanılmaktadır (168).

2.3.1. Real Time-PCR'da Kullanılan Prob Sistemleri ve Boyalar

A. Özgül Floresan İşaretli Problar

Taqman
Molecular Beacons
Scorpion Primerleri
Hibridizasyon Probları

B. Özgül Olmayan Floresan İşaretli Boyalar

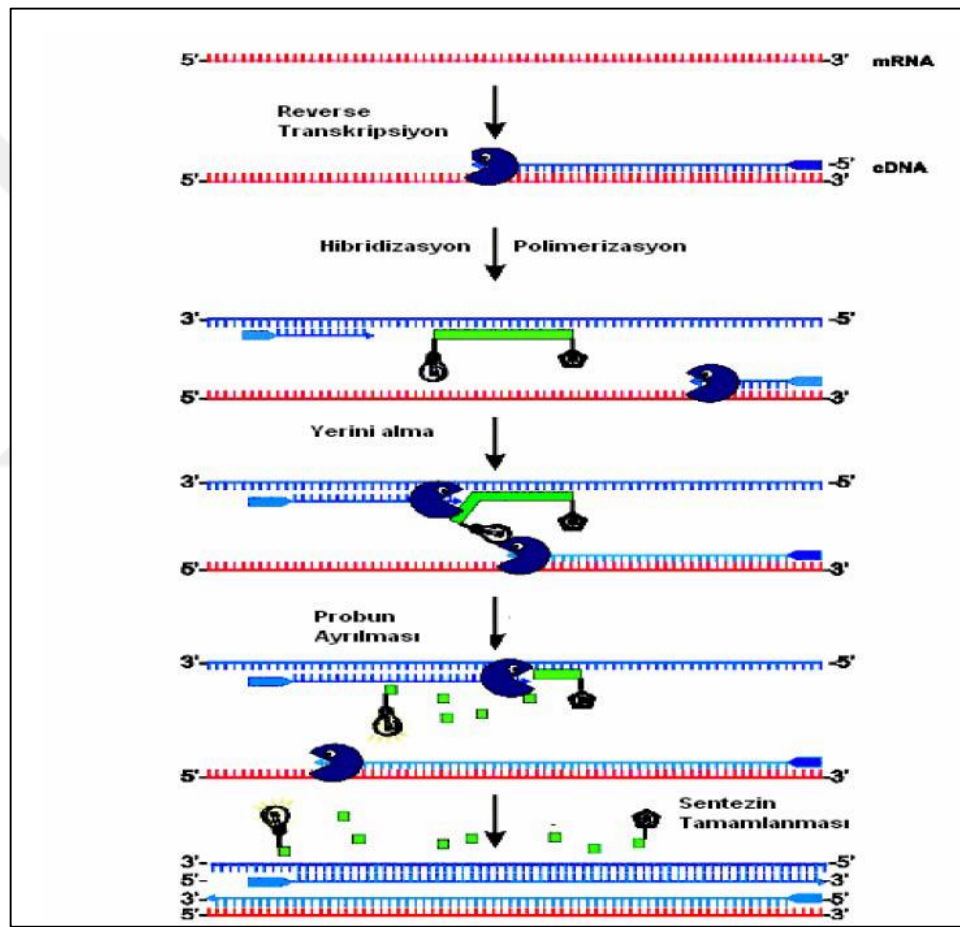
SYBR green I
Etidyum Bromid

2.3.2. Taqman Prob

TaqMan prob yöntemi double-dye oligonucleotide, dual labeled prob veya 5' nuclease prob olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob bulunur. Floresan işaretli probun 5' ucunda fluorophore (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda quencher (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) vardır. Probun 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya, primerlerin bağlanma bölgelerinin arasına bağlanır. Bu sırada floresan sinyal ölçümü düşüktür. Primerler bağlandıktan sonra

yeni zincir oluşmaya başlar. Taq DNA polimeraz enzimi probun bağlı olduğu bölgeye gelince 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbestleşen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün miktarı ile paralel olarak sinyal seviyesi de artmaya devam eder (169) (Şekil 13).

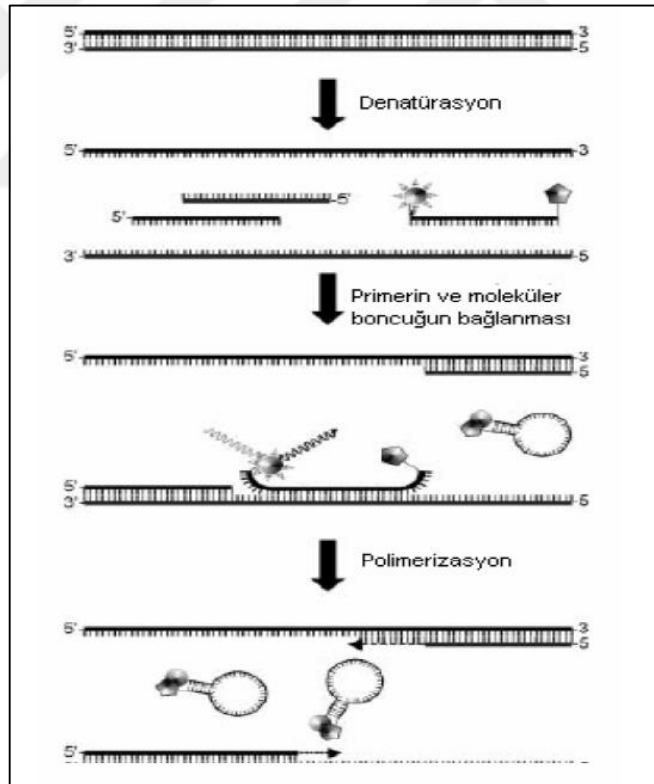
TaqMan prob yönteminde mutasyon tespitinin yanında sayısal değerlere de ulaşılabilirdiğinden, bu yöntem hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin oluşturulmasında kullanılır (170).



Şekil 13. Taqman probu (168)

2.3.3. Moleküler Boncuk Yöntemi

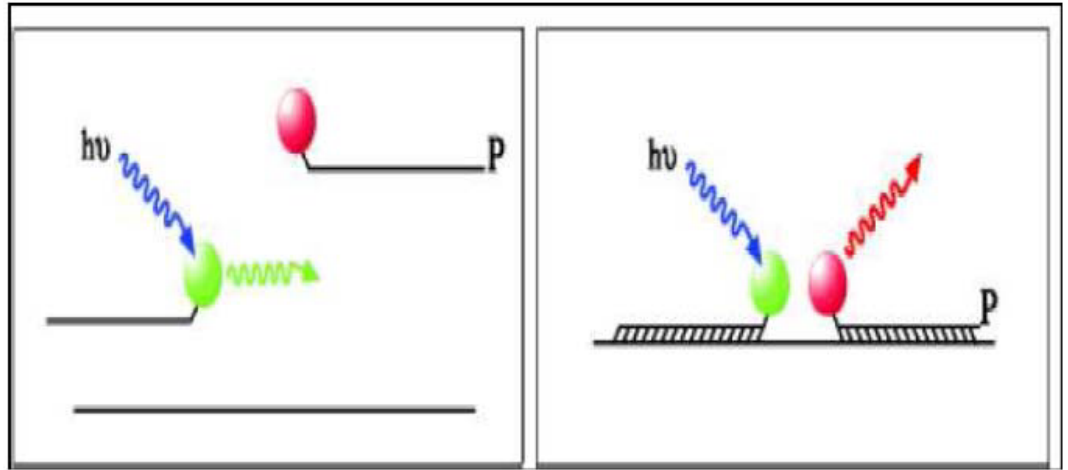
Moleküler boncuk yönteminde saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Düz olan uç kısımlarda 2 adet florokrom boya içermektedir ve baskılayıcı florofofor diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyonda serbest haldeyken ışığa yapmaz. İstenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında hedef DNA dizisine göre dizayn edilen probun konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Moleküler boncuk, hedef DNA dizisi ile hibridize olur olmaz yapısı değişir, boyalar birbirlerinden uzaklaşır ve floresan miktarı artar (Şekil 14). Moleküler boncuk yöntemi en sık SNP çalışmaları, genetik tarama, farmakogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır (171).



Şekil 14. Moleküler boncuk yöntemi (171)

2.3.4. Hibridizasyon Prob Yöntemi

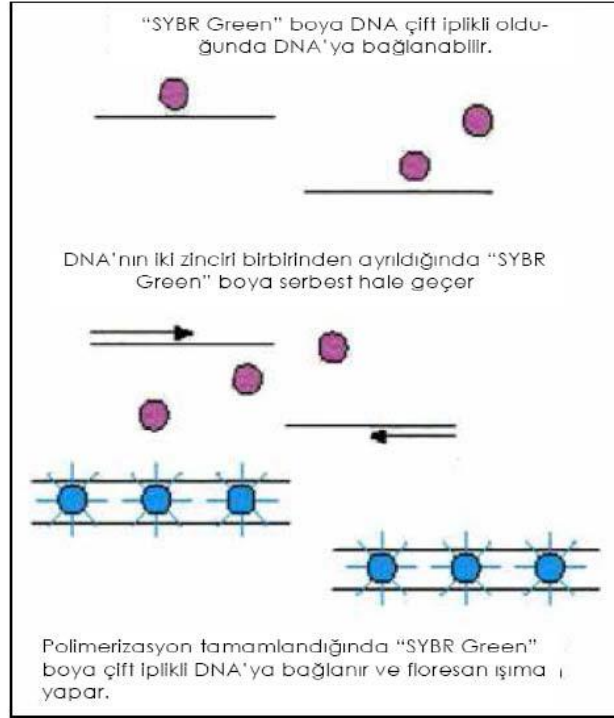
Bu yöntem Roche tarafından LightCycler PCR cihazında kullanılmak için geliştirilmiştir (172). İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donör), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. İki probun PCR reaksiyonu sırasında hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaşmasıyla bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji donör boyadan acceptor boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile paralel olarak artar (173)



Şekil 15. Hibridizasyon prob yöntemi

2.3.5. Sybr Green I

SYBR Green I yöntemi spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında kullanılır. SYBR Green boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak real-time PCR cihazında okunan floresanın miktarı da artar (Şekil 16). En sık kullanılan boya SYBR Green I'dir. Dalga boyu 497 nm'e yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Amplifikasyon döngüsü 30 olduğunda çift sarmal DNA'nın küçük oluğuna bağlanan boya yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder (174).



Şekil 16. SYBR Green metodu

Primerler bağlanıp uzama başladığında SYBR Green çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan vermeye başlar. İlk döngüden itibaren ürün miktarı arttıkça floresan miktarı da artar ve bu artış real-time cihazının monitöründen izlenebilir (174). Bu yöntem optimize PCR şartlarında ve iyi dizayn edilmiş primerler ile çok sayıda hedef genin çoğaltılmasına imkan tanır. Floresan işaretli problemler kullanılmadığından maliyeti ucuzdur. Ancak dezavantaj olarak, istenmeyen PCR ürünlerin çoğalması da floresan oluşturacağından hedef DNA'nın çoğaldığına dair yanlış pozitif sonuç alınabilir. Ortamda hedef DNA dizisi yokken primerler birbiri ile bağlanarak primer dimerleri oluşturup floresan ışımaya verebilir. Erime eğrisi analizleri (melting curve, dissociation) çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için gereklidir. Erime eğrisi analizi için cihaz PCR tüplerini ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= T_m) floresan boya serbest kalır ve floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın kendine özgü bir erime sıcaklığı (T_m) derecesi vardır. Bu derece çoğalan DNA uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. İstenmeyen ürünler

çoğalmışsa (primer dimerlerinde) hedef DNA parçasının T_m derecesinden farklı bir T_m derecesi olacaktır. Bu yöntemle daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (175).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastaların Seçimi ve Kayıtların Tutulması

Yaptığımız çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne başvuran 2013-2016 tarihleri arasında moleküler analizi yapılmış AAA hastalarında, mtDNA kopya sayısı değişikliklerinin AAA hastalığı ile ilişkisinin araştırılması için, AAA tanılı hastalardan alınmış periferik kan örneklerinden elde edilmiş ve halen arşivimizde bulunan izole edilmiş DNA örnekleri kullanılmıştır. Ailevi Akdeniz ateşi ile takip edilen, MEFV geninde M694V homozigot mutasyonu tespit edilmiş, amiloidozisli hastalar ve sağlıklı kontrollerden seçilmiş, 50'şer bireyden oluşan 2 ayrı grup çalışmaya katılmıştır. Kontrol grubu olarak AAA olmayan ve herhangi bir MEFV mutasyonunu veya polimorfizmini taşımayan bireyler çalışmaya alınmıştır. Hasta grubu ve kontrol grubunun yaş aralığı 18-40 olarak belirlenmiştir. Yaşlanmanın mitokondri disfonksiyonuna etkisi göz önünde bulundurularak kontrol grubunun seçiminde, hasta grubunun yaş ortalamasına yakın bir yaş ortalamasının sağlanmasına dikkat edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda şiddetli D vitamini eksikliği ile kolşisin direnci arasında anlamlılık bulunduğu ve bu durumun hastalarda mtDNA kopya sayısından bağımsız olarak amiloidozis riskini arttırdığı düşünülerek, şiddetli D vitamini eksikliği olan hastalar çalışmaya alınmamıştır (176). Kolşisin kullanmasına rağmen amiloidozis geliştiren hastalarda parsiyel veya komplet olarak kolşisine direnç olduğu düşünülmektedir; fakat AAA'da kolşisin direnci ile ilgili uluslararası bir kriter skalası olmadığı için hastalara kolşisin direnci açısından bir sınıflama veya puanlama yapılamamıştır. Ailevi Akdeniz Ateşi dışında otoinflamatuvar, kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıkları olan hastalar çalışma dışında bırakılmıştır. Ayrıca sigara ve sürekli kimyasal maruziyetinin de mtDNA kopya sayısını etkilediği tespit edildiği için, çalışma grupları oluşturulurken hastaların bu yönde öykülerinin olmamasına dikkat edilmiştir (177, 178). Çalışmaya başlamadan önce Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulundan etik kurul onayı alınmıştır (sayı: 2016-4/6).

3.2. Veri Analizi

Veriler SPSS İstatistik Paket programında değerlendirildi. Bağımsız iki grubu normal dağılım gösteren sayısal değişkenler açısından karşılaştırmak için Student T testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistik olarak aritmetik ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler verildi, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.3. Moleküler Analizler

3.3.1. Total DNA İzolasyonu

İzolasyonda kullanılan malzemeler

1. DNA izolasyon kiti “DNeasy Blood & Tissue Kit” (QIAGEN®, Germany)
2. Mikrosantrifüj
3. Termomikser
4. Pipet ve pipet ucu
5. Vorteks
6. Mikrosantrifüj tüpleri (1,5 ml veya 2ml)
7. Distile su - Etil alkol (>%96)

3.3.1.1. İzolasyon Protokolü

1. Mikrosantrifüj tüpünün içerisine (1,5 ml veya 2 ml’lik), 20 µl proteinaz K pipetlendi. Üzerine 5–10 µl koagüle olmamış kan örneği eklendi. Mikrosantrifüj tüpündeki total volüm eklenen PBS solüsyonu ile 220 µl’ye ayarlandı. RNA-free izolasyon materyali elde etmek için, 4 µl RNase A (100 mg/ml) solüsyonu eklendi ve vorteksleme sonrasında 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
2. Etanol eklenmemiş halde 200 µl Buffer AL eklendikten sonra vorteksten geçirildi ve 56°C’de 10 dakika inkübe edildi.
3. Örneğe 200 µl etanol (96–100%) vorteksle karıştırılarak eklendi.

4. Üçüncü basamakta hazırlanan karışım pipet vasıtasıyla DNAeasy Mini spin kolonun içerisindeki 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. Santrifüj işlemi $>6000 \times g$ (8000 rpm) hızında 1 dakika süreyle gerçekleştirildi. Santrifüj artıklarının biriktiği toplama tüpü atıldı.
5. DNAeasy Mini spin kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı, 500 μ l Buffer AW1 eklendi, santrifüj işlemi $>6000 \times g$ (8000 rpm) hızında 1 dakika süreyle gerçekleştirildi. Santrifüj artıklarının biriktiği toplama tüpü atıldı.
6. DNAeasy Mini spin kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı, 500 μ l Buffer AW2 eklendi, santrifüj işlemi $20000 \times g$ (14000 rpm) hızında 3 dakika süreyle gerçekleştirildi. Santrifüj artıklarının biriktiği toplama tüpü atıldı.
7. DNAeasy Mini spin kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı, 200 μ l Buffer AE DNAeasy membrana pipetlenerek eklendi. Hazırlanan ürün oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra, santrifüj işlemi $>6000 \times g$ (8000 rpm) hızında 1 dakika süreyle gerçekleştirildi.
8. Örnekler çalışma anına kadar -20°C 'de saklandı.

3.3.1.2. Spektrofotometrede İzole Edilen DNA Örneklerinin Konsantrasyonunun Kantitatif Ölçümü

1. İzole edilen DNA'lar 1/600 oranında dilüe edildi ve UV spektrofotometre cihazında DNA için spektrum aralığı 260 nm ve protein için 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçüldü.
2. Dalga boyu 260 nm olarak okunan absorbans değerlerinden, örneklerdeki DNA konsantrasyonu hesaplandı. Tespit edilen 260 nm OD (optik dansite) ölçümünün 280 nm OD ölçümüne oranı, DNA'mızın protein ya da RNA ile kontamine olup olmadığı hakkında bilgi verir. Ölçümlerde A_{260} / A_{280} oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması beklenir. OD değerinin 2,0'nin üzerinde olması RNA kontaminasyonuna, 1,8'in altında olması da protein kontaminasyonuna işaret eder. PCR sonuçlarının sağlıklı çıkması için DNA'ların uygun saflıkta olması gerekmektedir.

3. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere DNA'lar, DNA hidrasyon solüsyonu ile 50 ng/ µl olacak şekilde sulandırıldı. Her bir örnek için kontrol amaçlı 2 defa okuma yapılmış olup, bu yöntemle DNA örneklerinin saflığı kontrol edildi ve miktarı saptandı.
4. DNA konsantrasyonu düşük bulunan örneklerde, istenilen değere ulaşıncaya kadar, kan örneklerinden DNA elde etme işlemleri tekrarlandı

3.3.2. MEFV Geninde Mutasyon Analizi

3.3.2.1. PCR ile MEFV Gen Bölgesinin Çoğaltılması

PCR için kullanılan karışım

1. 5X tampon	5 µl
2. MgCl (25 mM)	1,5 µl
3. dNTP	0,5 µl
4. Primer F (10 pmol)	1 µl
5. Primer R (10 pmol)	1 µl
6. Taq polimeraz	0,25 µl
7. Distile su	9 µl
8. DNA (10-50 ng/µl)	3 µl

3.3.2.2. PCR Programı

95 °C	1 dakika
95 °C	30 saniye
69 °C	30 saniye
72 °C	30 saniye (20 döngü)
95 °C	30 saniye (20 döngü)
58 °C	45 saniye (20 döngü)
2 °C	1 dakika (20 döngü)
72 °C	10 dakika (20 döngü)
4 °C	∞

3.3.2.3. Pyrosekans Yöntemi İle Dizi Analizi ve Mutasyonların Tespiti

Pyrosekans işleminde kullanılan malzemeler

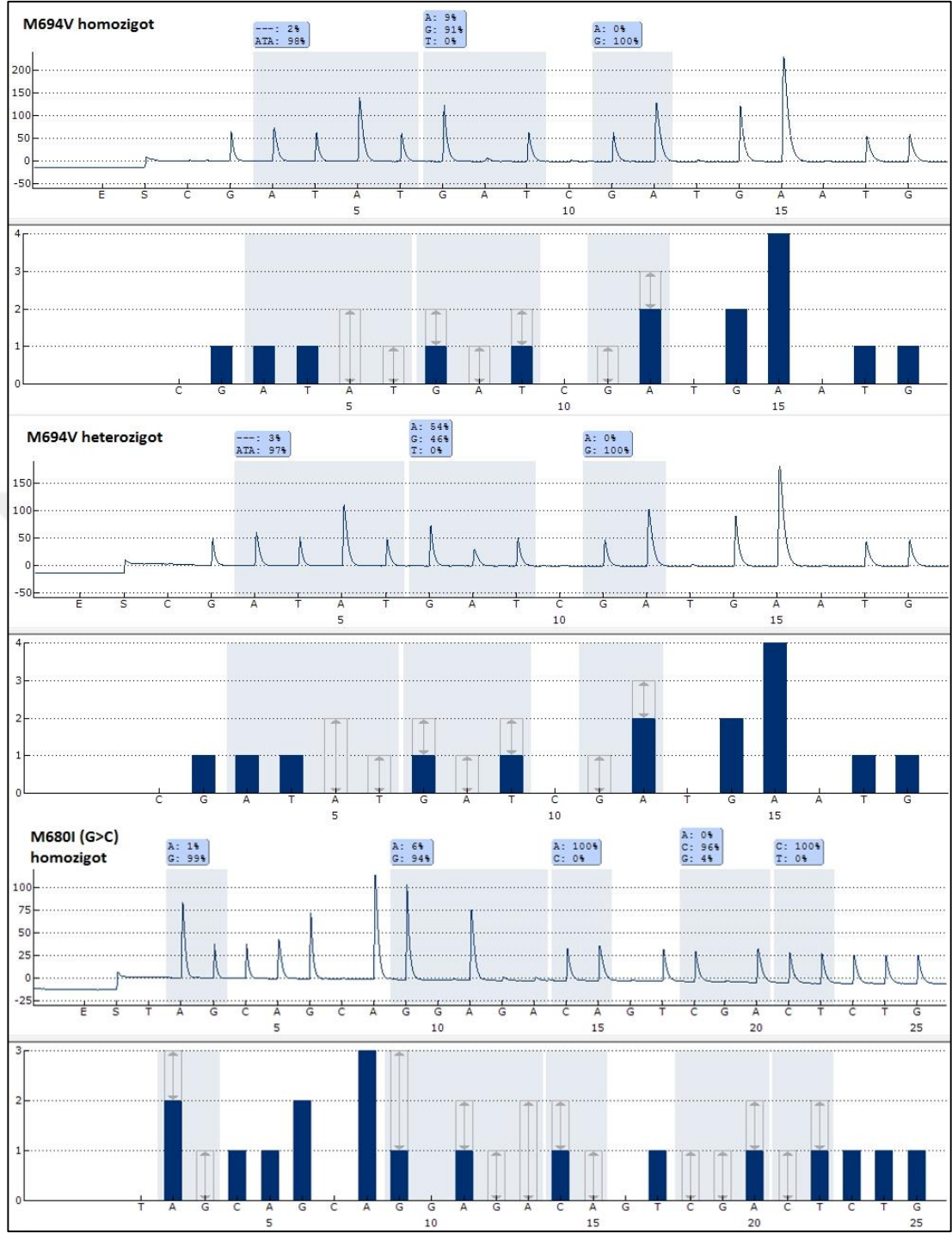
1. 24 kuyucuklu plate
2. Mastermix solüsyonu
3. Mikrosantrifüj
4. Pipet ve pipet ucu
5. Vorteks
6. Annealing buffer
7. Distile su - Etil alkol (>%96)
8. Sekans primerleri (Tablo 3)

Pyrosekans protokolü

1. 24 kuyucuklu PCR plate'i veya strip kullanarak her bir kuyucuğa 70 µl mastermix koyuldu.
2. Run dosyasında tanımlandığı şekilde her bir kuyucuğa 10 µl ilgili PCR ürünü eklendi.
3. Plate veya stripleri birkaç kere ters yüz ettikten sonra çalkalayıcıya koyup, oda sıcaklığında 1400 rpm'de 5-10 dakika çalkalandı.
4. Q24 Plate'in her bir kuyucuğuna run dosyasında hazırlandığı şekilde 2,5 µl sekans primeri ve 22,5 µl annealing buffer koyulur. PCR örneklerini pirifikasyondan geçirmek için sırasıyla %70'lik etanol, denatürasyon buffer'ı ve baş buffer'dan geçirildi.
5. Daha sonra vakum pompasıyla örnekler çektilir. Sonrasında pompa kapatılarak örneklerle primerlerin karışması sağlandı. Örnekler 80 °C'de hibridizasyona konularak 2 dakikada primerlerle örneklerin hibridize olması sağlandı. 10 dakika oda ısında örnekler bekletildi ve Pyromark Q24 cihazına (Şekil 18) yüklendi. MEFV geninde mutasyonu sık görülen 22 bölge, 45 dakika boyunca cihazda okunduktan sonra bilgisayarda Pyromark Q24 Software yazılım programında sonuçların analizi yapıldı (Şekil 17).

Tablo 3. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen bölgesi	Primer dizisi	Gen bölgesinin uzunluğu
MEFV_E2.1F MEFV_E2.1R MEFV_E2.2F MEFV_E2.2R	CTCCTCTGCCCTGAATCTTG AGGGCCTGCACTCCTTCT CCTGAGCAAACGCAGAGAG GGCCAGCCATTCTTTCTC	494bp
MEFV_E3F MEFV_E3R	AACTTGGGTTTGCCATTCAG TAATGCACCAACAACCCAGA	493bp
MEFV_E5F MEFV_E5R	AGCCACCTCTTATCCACCT AGGCATCCTATAGGCACAG	228bp
MEFV_E10.1F MEFV_E10.1R MEFV_E10.2F MEFV_E10.2R	TACCCTGTCCCTGTTTCCTG GCTTGGGAGGCTCCTTTATT AGAATGGCTACTGGGTGGTG GTCGGCATTCCGTGACTATT	370bp



Şekil 17. Bazı MEFV mutasyonlarının pyrosekans görüntüleri



Şekil 18. Pyromark Q24 pyrosekans cihazı

3.3.3. MtDNA Kopya Sayısının Belirlenmesi

Örneklerin mtDNA kopya sayılarının belirlenmesi için Rotor-Gene-Q (Heidelberg, Germany) RT-PCR cihazında kantitatif ölçüm yapıldı (Şekil 19). Ölçüm için referans olarak çekirdek DNA'sı ve mtDNA'dan seçilen bölgeler referans alındı. Çekirdek DNA'sı için belirlenen beta-globin (HBB) ve mtDNA için belirlenen NADH dehidrogenaz – 1 (ND-1) genlerine uygun primerlere (Qiagen, Heidelberg, Germany) ait özellikler Tablo 4'de özetlendi. Mitokondriyal DNA kopya sayısının belirlenebilmesi için, her bir örnek için oluşan mtDNA C_t ve çekirdek DNA C_t değerlerinin farkı alınarak ($\Delta C_t = \text{çekirdek DNA } C_t - \text{mtDNA } C_t$), mtDNA kopya

sayısı = $2^{\Delta Ct}$ formülü uygulanmıştır. Sonrasında her iki grup için tespit edilen mtDNA kopya sayıları arasında istatistiki olarak kıyaslama yapılmıştır.

3.3.3.1. RT-PCR İçin Kullanılan Karışım

1. RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 µl
2. RT ² qPCR Primer Assay (10 µM stock)	1 µl
3. RNase-free water	10,5 µl
4. DNA (10-50 ng/µl)	1 µl

3.3.3.2. RT-PCR Programı

95 °C	10 dakika
95 °C	15 saniye (40 döngü)
60 °C	60 saniye (40 döngü)

Tablo 4. RT-PCR işlemi için kullanılan primerler ve ilgili gen bölgeleri

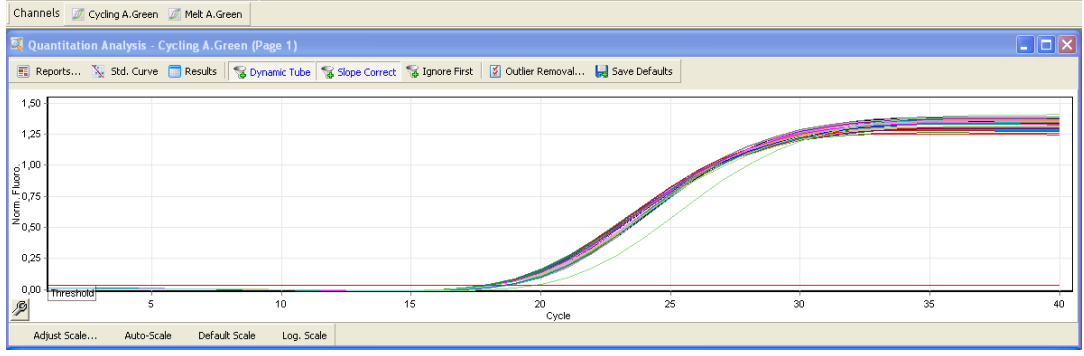
Gen bölgesi	Primer dizisi
ND-1 / mtDNA F	TTAGTTGCTTGGTTGTGTATTCC
ND-1 / mtDNA R	GAAAAAGGTAAAAAACTCTTTCAAGC
HBB F	GGAGATGCCTCAGAAACTGC
HBB R	AGGTTGGAGGTCCGAAAGTT



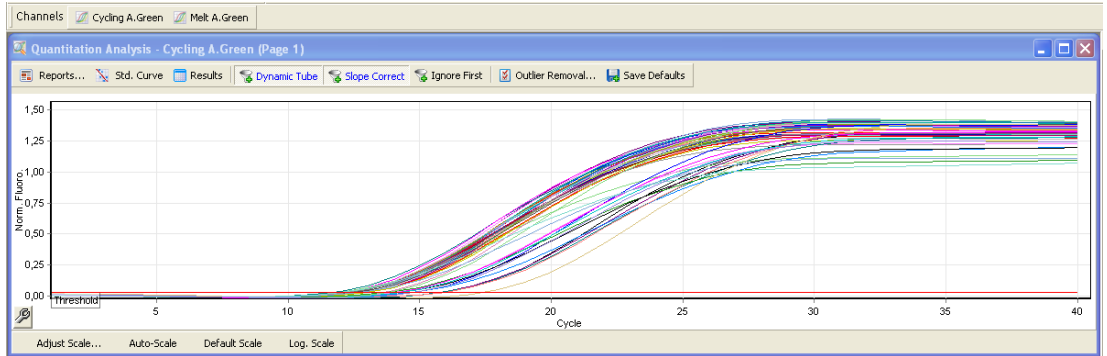
Şekil 19. Rotor-Gene-Q (Heidelberg, Germany) RT-PCR cihazı

3.3.3.3. Sonuçların Analizi

PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştikçe SYBR Green boyasının salınarak verdiği floresans Real-Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı. Amplifikasyon Rotor-Gene-Q Real-Time PCR cihazının bilgisayarından online olarak da izlendi. Standart eğri oluşturma programında PCR etkinliği 2 olarak belirlendi. Cihazın analiz seçeneklerinden rölatif ölçüm basamağı seçildi. Örnekler için HBB/ND-1 rölatif ekspresyon değerleri de cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı (Şekil 20, 21).



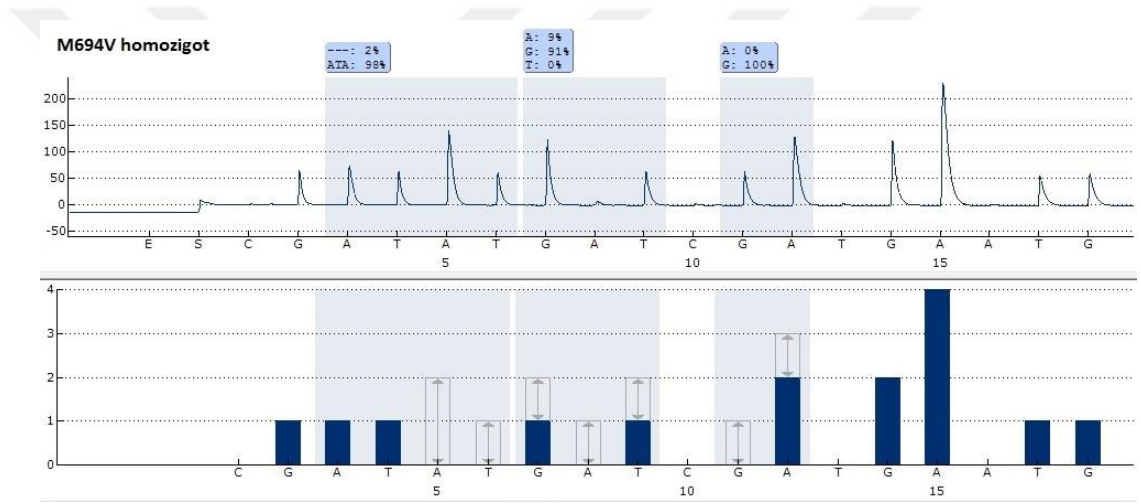
Şekil 20. HBB geni için incelenen olguların amplifikasyon eğrileri



Şekil 21. ND-1 geni için incelenen olguların amplifikasyon eğrileri

4. BULGULAR

Çalışmamız için AAA ile takip edilen, pyrosekans yöntemi ile MEFV geninde M694V homozigot mutasyonu tespit edilmiş (Şekil 22), amiloidozisli hastalar ve sağlıklı kontrollerden seçilmiş, 50'şer bireyden oluşan 2 ayrı grup oluşturulmuştur. Hasta grubu ve kontrol grubunun yaş aralığı 18-40 olarak belirlenmiştir. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaş özellikleri Tablo 5'de özetlenmiştir.



Şekil 22. M694V homozigot mutasyonu saptanmış hastaların pyrosekans görüntüsü

Tablo 5. AAA hastaları ve kontrol grubunun cinsiyet ve yaş özellikleri

Grup	N	Cinsiyet (E/K)	Ortalama Yaş
AAA	50	E(32)/K(18)	33,4±5,6
Kontrol	50	E(30)/K(20)	30,8±4,2

Yapılan hesaplamalar sonucunda AAA hastalarında mtDNA kopya sayısı ortalama $48,19 \pm 27,3$, kontrol grubunda ise $80,31 \pm 36,97$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 23, 24). Çalışma sırasında RT-PCR’da tespit edilen C_t değerleri Tablo 6’da gösterilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının mtDNA kopya sayıları istatistiki olarak karşılaştırıldığında (Tablo 7), iki grup arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$).

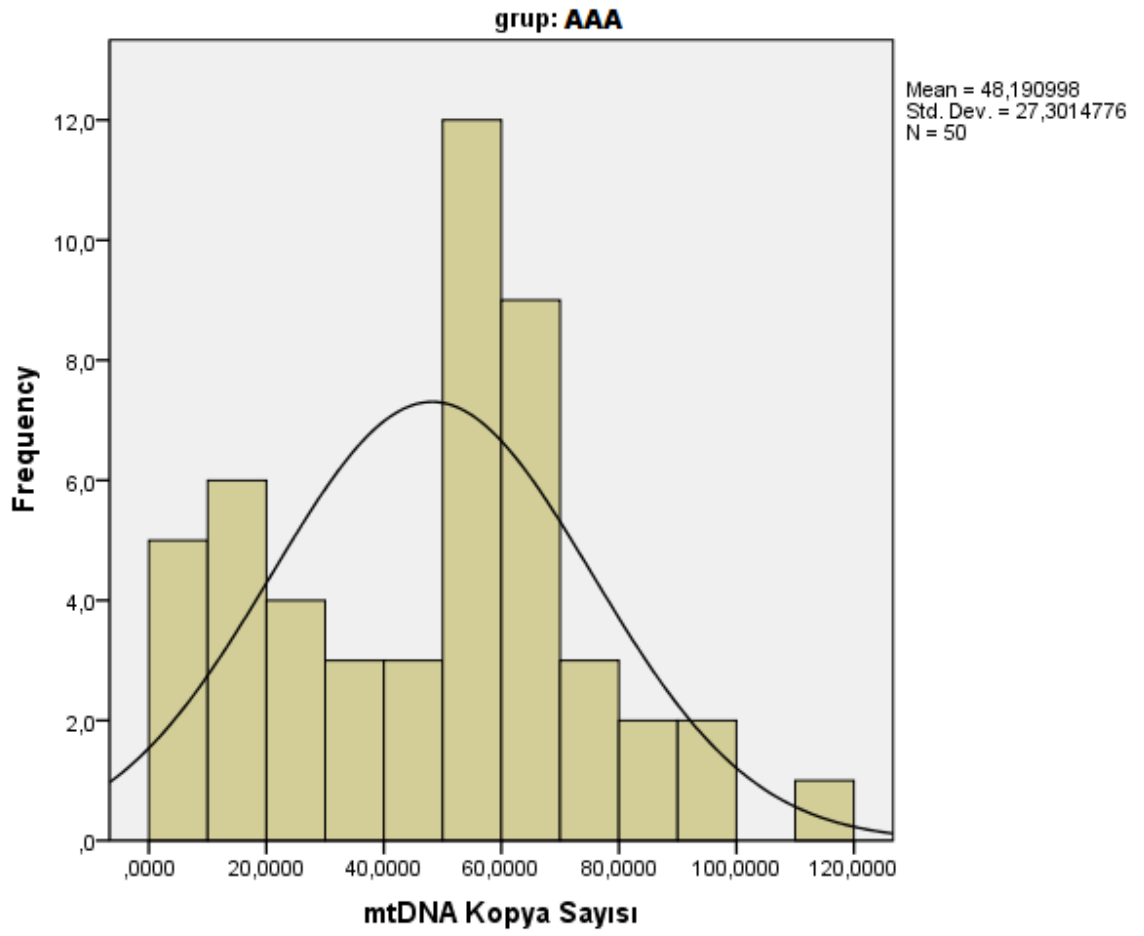
Tablo 6. AAA hastaları ve kontrol grubunda tespit edilen C_t değerleri

Örnek No	AAA		Kontrol Grubu	
	Çekirdek DNA	mtDNA	Çekirdek DNA	mtDNA
1	18,7	12,31	17,78	12,94
2	18,79	12,97	17,82	12,7
3	18,11	12,34	18,6	12,3
4	18,65	12,21	18	12,27
5	18,78	12,19	18,54	12,09
6	18,76	12,8	17,98	11,01
7	18,55	11,65	18,08	12,34
8	18,57	12,84	18,62	12,01
9	18,24	12,24	17,94	13,27
10	18,67	12,1	18,56	12,93
11	18,1	15,86	18,52	13,01
12	18,16	12,17	18,5	13,2
13	18,68	12,97	18,02	12,48
14	17,93	11,97	18,7	12,04
15	18,19	12,37	18,98	12,26
16	18,84	12,72	18,03	12,12
17	18,24	12,27	17,99	12,48
18	18,9	12,79	18,48	11,14
19	19,43	13,61	18,63	11,82
20	17,99	12,39	19,27	12,58
21	18,25	12,25	18,51	11,29
22	18,64	12,91	18,73	12,07
23	18,56	12,35	17,86	11,24
24	18,7	12,84	18,94	12,23
25	18,17	12,85	18,55	12,39
26	18,77	12,92	17,79	12,94
27	18,56	12,27	18,99	12,32
28	18,74	12,85	18,04	11,54
29	18,15	12,17	17,92	13,07
30	17,55	12,35	17,85	11,02
31	18,14	12,42	18,93	12,43
32	18,02	12,55	18,1	11,08
33	18,67	12,94	18,73	12,29

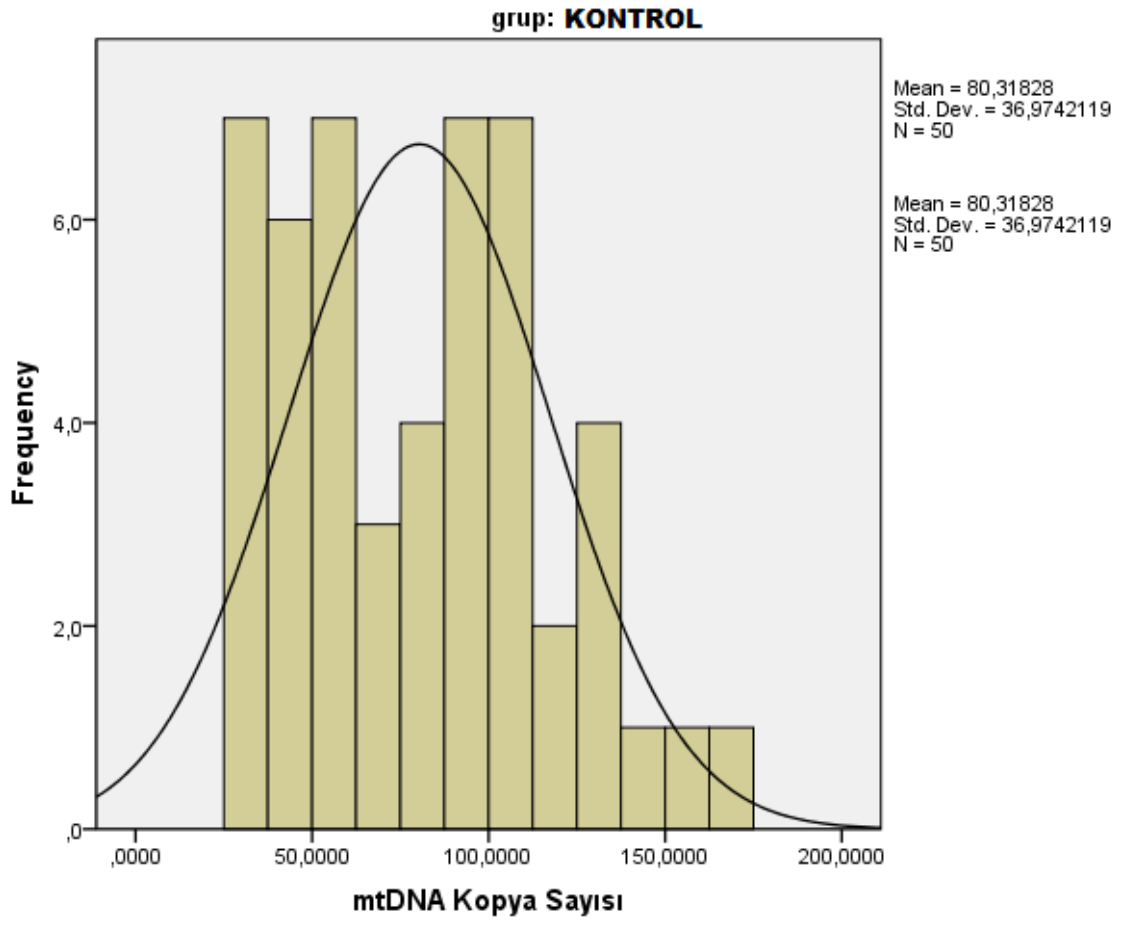
34	18,27	13,04	18,04	13,21
35	19,39	14,76	17,8	11,89
36	17,71	15,76	17,85	12,19
37	18,69	14,04	18,03	11,05
38	18,18	14,75	18,92	12,32
39	18,1	15,81	17,87	11,36
40	19,53	15,85	18,13	11,98
41	18,12	13,81	18,04	11,19
42	17,64	14,12	18,83	12,48
43	17,25	14,3	17,98	12,95
44	18,25	14,25	17,87	12,28
45	19,54	17,37	18,02	12,34
46	17,21	13,73	28,53	21,11
47	17,63	12,08	28,48	21,9
48	18,84	12,7	18,17	12,17
49	19,43	14,79	19,68	13,97
50	19,43	14,79	18,19	11,19

Tablo 7. AAA hastaları ve kontrol grubunda tespit edilen mtDNA kopya sayılarının istatistiksel analizi

Grup		N	Minimum	Maksimum	Ortalama	P Değeri
AAA	mtDNA Kopya Sayısı	50	3,8637	119,4282	48,190998	<0,001
KONTROL	mtDNA Kopya Sayısı	50	25,4572	171,2547	80,318280	



Şekil 23. Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında mtDNA kopya sayısı dağılımı



Şekil 24. Kontrol grubunda mtDNA kopya sayısı dağılımı

5. TARTIŞMA

Mitokondri, birçok biyolojik fonksiyon gerçekleştirmekle birlikte, özellikle hücrenin primer enerji kaynağı olma görevini üstlenerek, oksidatif fosforilasyon yoluyla hücre içerisindeki ATP üretiminin neredeyse tamamını yapmaktadır. Oksidatif fosforilasyon mekanizmasının en önemli dezavantajı ise reaktif oksijen radikallerinin kaynağını olmasıdır. Mitokondri 16.569 baz dizisinden oluşan, çift zincirli, sirküler DNA yapısına sahip olup; çekirdek DNA'sında bulunan protein kodlamayan intron bölgelerine, kondansasyonu ve dış etkilere korunmayı sağlayan histon proteinlerine ve yeterli DNA onarım mekanizmasına sahip olmaması sebebiyle, oksidatif hasara çekirdek DNA'sından daha yatkındır (179).

Her mitokondri ortalama 2-10 arası mtDNA kopyası içermekle birlikte, her hücrede yüzlerce hatta binlerce mitokondri bulunabilir (180). Her hücrede farklı sayıda mitokondri bulunması sebebiyle, çalışmamızda mitokondri başına düşen mtDNA miktarı yerine, izole edilen total DNA'daki mtDNA'nın çekirdek DNA'sına oranı baz alınmıştır. Mitokondri eritrositler dışında her hücre tipinde bulunmaktadır ve ayrıca aynı organizmaya ait farklı dokulardaki hücrelerde dahi sayısı değişebilmektedir.

Mitokondri replikasyonunda etkili olan DNA polimeraz gama kompleksinin iki alt ünitesinden birinin üretiminden sorumlu olan çekirdek DNA'sında yerleşik POLG geninin mutasyonları da mtDNA kopya sayısında azalmaya neden olabilmektedir (181).

Daha önce birçok hastalık ile mtDNA kopya sayısı değişiklikleri arasında ilişki kurulmuştur. Yaşlanma ile ilgili olarak da artmış oksidatif stres sebebiyle periferik kandaki lökositlerde yüksek mtDNA saptanan kadınların kognitif fonksiyonlarının, lökositlerinde daha düşük mtDNA kopya sayısı içerenlere göre daha iyi düzeyde olduğu görülmüştür (182). Beyin dokusu oksidatif hasara karşı korunmasızdır, bu sebeple uzamış oksidatif stresin demans gelişimini arttırabileceği belirtilmiştir (183). Oksidatif hasarın belirlenebilmesi için yapılan çalışmalar da mtDNA üzerindeki değişikliklere yoğunlaşmıştır. Daha önce de hastalık bazında

özellikle Alzheimer hastalığı ilgili olarak mtDNA'da kalitatif ve morfometrik değişimler gösterilmiştir (184). Mitokondrinin sinir sistemi için önemi, sinaptik iletim için gerekli enerji ihtiyacı ile açıklanmaktadır. Birçok çalışma sinir sisteminde mitokondriyal enerji döngüsünün bozulmasının, Alzheimer hastalığının fizyopatolojisini oluşturan β -amiloid miktarını ve nörofibriler yumakların oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir (185). Yaşlanmanın mtDNA kopya sayısına etkisi göz önünde bulundurularak, çalışmamızda incelenen hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamasının birbirine yakın olmasına dikkat edilmiştir.

Yine merkezi sinir sistemi ile ilgili, kognitif fonksiyonların azalmasından farklı olarak davranış bozuklukları temelinde sık görülen otistik spektrum bozukluklarında (OSB) da mitokondriyal disfonksiyon ile ilişki kurulmuş ve mitokondriyal hastalıkların prevalansının da OSB hastalarında daha yüksek olduğu gösterilmiştir (186, 187). OSB tanımı heterojen bir gelişimsel hastalık grubunu kapsamakta olup bu grupta; otizm, Rett sendromu, Asperger sendromu ve sınıflanmamış davranış bozuklukları gibi hastalıklar bulunmaktadır. OSB hastalarında periferik kan hücrelerinden yapılan bir araştırmada ise mtDNA kopya sayısı miktarında, kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir (14). Postmortem beyin dokusundan yapılan mtDNA kopya sayısı ölçümlerinde de periferik kan hücrelerinden elde edilen sonucu destekler nitelikte, OSB hastalarının beyin dokularında artmış mtDNA kopya sayısı tespit edilmiştir (188). OSB ile ilgili çalışmalarda mitokondriyal disfonksiyon gösterilmesine rağmen, mtDNA kopya sayılarında artış gözlenmesinin sebebi olarak; oksidatif strese yanıt olarak replikasyon artış ve degradasyonda azalma gösterilmiştir (14).

Nörodejeneratif hastalıklar grubundan Huntington hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışma, mtDNA kopya sayısının hastalık öncesi, hastalık başlangıcı ve hastalık kliniğinin oturmasından sonraki dönemler arasındaki değişimlerine ışık tutmuştur (189). Huntington hastalarının periferik kanları ve kontrol amacıyla transgenik farelerle yapılan çalışmada hastalık kliniği henüz başlamamış fakat aile öyküsü olan ve kendisinde de artmış CAG tekrarı tespit edilmiş hastalarda mtDNA kopya sayısında artış, hastalığın kliniğinin kendini göstermeye başladığı dönemde olan hastalarda mtDNA kopya sayısında azalma, hastalık kliniğinin oturduğu bireylerde

ise mtDNA kopya sayısında tekrar azalma gözlenmiştir (189). Bizim çalışmamızda kullandığımız hastalarda hastalık fazına göre ayırım yapılmamıştır. AAA ile ilgili yapılacak, aile taramalarında M694V homozigot mutasyonu saptanmış, henüz atakların başlamadığı çocuklardan ve atakların başlayıp hastalık kliniğinin oturduğu hastalardan mtDNA kopya sayılarına yönelik olarak yapılacak araştırmaların, AAA hastalarının yaşam periyotları arasında mtDNA değişimleri hakkında fikir sahibi olmamızı sağlayacağı düşünülmektedir.

Parkinson hastalığı için yapılan birçok çalışmada da azalmış mtDNA kopya sayısının, hem periferik kan hem de beyin dokusunda yapılan çalışmalarda hastalık gelişme riskinin anlaşılmasında önemli bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir (190).

Ateroskleroz zemininde gerçekleştiği bilinen kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) ve obstrüktif uyku apnesi gibi hastalıkların şiddeti mtDNA kopya sayısı ile ilişkilendirilmiş olup, özellikle bu hastalıkların derecesine göre artan hipoksinin oksidatif hasarı arttırarak mtDNA miktarını azalttığı görülmüştür (191). Yine kronik böbrek yetmezliği (KBY) patogenezinde mitokondriyal disfonksiyonun önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir. KBY ile yapılan araştırmalarda hem erken KBY geliştiren hastalarda, hem de KBY açısından önemli risk faktörleri olan diyabetli ve mikroalbuminüri hastalarda mtDNA kopya sayısında anlamlı düşüklük tespit edilmiştir (192).

Diyabetin mtDNA ile ilişkisi üzerine sağlıklı genç erkeklerde yapılan çalışmalarda yağ ve karbonhidrat oksidasyon hızı ile mtDNA kopya sayısı arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (193). Ayrıca çalışmada artmış insülin rezistansı ile azalmış mtDNA kopya sayısı arasında anlamlılık olduğu gösterilmiştir. Diyabetin moleküler patolojisinde kas ve yağ dokusundaki glukoz transporter kanallarının disfonksiyonu önemli rol oynamaktadır; bu durumla uyumlu olarak glukoz transporter geninin ekspresyon düzeyi ile mtDNA kopya sayısı azalması arasında anlamlı ilişki vardır (194). İnsülin rezistansı temelinde gerçekleşen ve endokrinolojik sorunlara yol açan polikistik over sendromunda da mitokondri disfonksiyonu ve azalmış mtDNA kopya sayısı tanımlanmıştır (195). Buradan yola çıkarak mtDNA

kopya sayısı değişikliklerinin sistemik ve endokrinolojik hastalıklarda önemli role sahip olduğu söylenebilmektedir (196).

Genetik zemini tam olarak aydınlatılamamış, multifaktöryel etyolojiye sahip olduğu düşünölen bir oftalmolojik sorun olan keratokonus ile ilgili olarak da mitokondri araştırmaları yapılmıştır. Bir grup keratokonuslu hastada mtDNA mutasyonları ve oksidatif stres mekanizmasının indirekt olarak hastalığın ortaya çıkması ve gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir (197). Bu hasta grubunda yapılan mtDNA kopya sayısı araştırmaları, keratokonusta mitokondriyal disfonksiyon tezini desteklemektedir (198).

Günümüzde toplum sağlığını etkileyen önemli bir sorun olan kadın ve erkek infertilitesi ile ilgili olarak da mitokondri ve mitokondri genomu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. İnsan memeli somatik hücrelerinde ortalama 100-10.000 arasında mtDNA kopyası bulunurken, insan oosit hücresi ortalama 200.000 mtDNA kopyası bulundurmaktadır. Ayrıca bu kopya sayısı oositin fertilizasyon kabiliyetine bağlı olarak artmaktadır (199). Oogenez sırasında mtDNA’da ciddi miktarda bir amplifikasyon olmasına rağmen, spermatogenez sırasında mtDNA içeriğinde dramatik olarak azalma olmaktadır. Spermatogenezdeki bu kaybın, spermatitlerin uzama fazı sırasında rezidüel cisimciklerin atılması ile olduğu düşünülmektedir. Spermatid sitoplazmasının büyük bir kısmını içeren rezidüel cisimcikler, atıldıktan sonra sertoli hücreleri tarafından fagositoza uğramaktadırlar. Ayrıca moleküler düzeyde de TFAM ekspresyon düzeyinin azalması ile spermatogenez sırasındaki mtDNA miktarındaki azalma açıklanmaktadır (200). Daha önce yapılan çalışmalar da fare sperm hücrelerinde semi-kantitatif southern blot yöntemi ile ölçölmüş mtDNA kopya sayısının 50-75 arasında olduğunu göstermiştir (201). Kantitatif PCR ile yapılan bir çalışmada olgun spermelerde ortalama 10 kopya mtDNA, spermatitlerde ise ortalama 150 kopya mtDNA olduğu gösterilmiştir (202).

Sperm oluşumu sırasındaki bu mtDNA depleasyonu, erken embriyo dönemindeki ubikinasyon bağımlı paternal mtDNA destrüksiyonunu destekleyerek, paternal mtDNA aktarımının engellenmesine katkı sağlamaktadır (203). Nokta mutasyonları, delesyonlar, heteroplazmi düzeyi ve mtDNA kopya sayısının erkek

infertilitesi ile ilişkisi gösterilmiştir. Anormal sperm hücrelerinde normal sperm hücrelerine göre daha yüksek düzeyde mtDNA kopyası tespit edilmiştir. Bu durumun düşük respiratuar zincir aktivitesine ve artmış anormal diferansiasyon ve maturasyon sonucunda artmış mitokondriyal biyogeneze tepki olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

Özetle, sperm olgunlaşması sırasında yetersiz mtDNA deplesyonu olması halinde, spermde anormal yönde diferansiasyon olasılığı artmaktadır (204). Oositler açısından bakıldığında ise 4000 kopyaya kadar düşen mtDNA içeriği, fertilizasyon ve blastokist aşamasını oluşturan preimplantasyon gelişimini etkilememektedir. Postimplantasyon döneminde bu eşik daha kritik olup 40.000-50.000 kopyanın altında implantasyon başarısını etkileyerek, infertiliteye sebep olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple, oositlerin fertilizasyon başarısı için, spermlerden farklı olarak yüksek mtDNA kopya sayısı gerekmektedir (205).

Hastalıklar dışında, çevresel bir faktör olarak sigara kullanımı da zamanla oksidatif hasarı artırarak mtDNA'da mutasyonlara, kopya sayısında azalmaya ve sonuçta mitokondriyal disfonksiyona yol açmaktadır (178). Sigara kullanımının bu etkisi göz önünde bulundurularak, çalışmamızın sonuçlarının etkilenmemesi açısından çalışma ve kontrol gruplarındaki hastaların sigara ve diğer tütün mamullerini kullanmayanlardan seçilmiştir. Sigara kullanımına ek olarak meslek hastalıklarına sebep olmasıyla bilinen benzen maruziyetine yönelik olarak yapılan mesleki benzen maruziyeti olan bireylerde mtDNA kopya sayısı değişikliklerinin araştırılması da çevresel etkenlere bir başka örnektir. Yapılan çalışmada, hematotoksik ve karsinojen olarak tanımlanmış ve genotoksik hasara da sebep olduğu bilinen benzen maddesinin mtDNA kopya sayısını arttırdığı gösterilmiştir (177). Benzen maruziyetinin oluşturduğu oksidatif strese cevap olarak hücrelerde mtDNA kopya sayısının arttığı öne sürülmüştür (177). Bu sebeple, çalışmamıza katılan hastalarda benzen maruziyeti öyküsü olmadığı anamnez sırasında teyit edilmiştir.

Kimyasal maruziyeti veya kullanımı bakımından, AAA hastalığında tek alternatif olarak kullanılan kolşisin molekülünün uzun dönemde mtDNA'ya etkisi

hakkında yapılmış herhangi bir çalışma mevcut değildir. Çalışma grubumuzda yer alan amiloidozis geliştirmiş hastaların uzun dönem kolşisin kullandığı ve kontrol grubundaki hastaların kolşisinin etkisinden muaf olduğu göz önünde bulundurulduğunda, daha sonraki çalışmalarda kolşisinin mtDNA üzerine etkisinin olup olmadığının tespitinin mevcut çalışmanın standardizasyonu açısından da önemli olduğu görülmektedir.

AAA ile ilgili olarak daha önce mtDNA kopya sayısı veya mtDNA'daki diğer değişikliklere yönelik bir çalışma olmamakla birlikte, bazı romatolojik hastalıklarda mtDNA değişiklikleri araştırılmıştır. Bu kapsamda SLE ile takipli hastalarda lupus nefriti geliştiren hastaların mtDNA değişikliklerine yönelik olarak yapılan bir çalışmada bizim çalışmamızdaki amiloidozis geliştiren AAA hastalarda mtDNA miktarında azalmaya paralel olarak; mtDNA kopya sayısı miktarında belirgin azalma tespit edilmiştir (13). Aynı çalışmada mtDNA kopya sayısı değişikliğine ek olarak, D310 bölgesinin heteroplazmisi de SLE hastalarında lupus nefriti ile ilişkili bulunmuştur. Buradan yola çıkarak, AAA hastaları için mitokondriyal genomdaki heteroplazmi oranları araştırılmaya açık bir konu olarak değerlendirilebilir. Yine romatolojik hastalıklar grubundan Sjögren sendromu ve romatoid artrit için mtDNA'nın oksidatif hasarına ve mitokondriyal disfonksiyona yönelik yapılan biyokimyasal testlerde, Sjögren sendromu ve romatoid artritin mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkisi gösterilmiştir (206, 207).

Kolşisin tedavisine rağmen amiloidozis geliştirmiş hastalar, kolşisine dirençli hastalar olarak tanımlanmaktadır. Kolşisin direncinin sebep olduğu renal amiloidozis, AAA hastalarında mortalite artışının en önemli sebebi olarak gösterilmektedir (208). Kolşisine dirençli hastalar da kendi içerisinde kolşisine parsiyel cevap veren ve hiç cevap vermeyenler olarak ikiye ayrılırlar. AAA hastalarının üçte birinde kolşisine parsiyel direnç mevcuttur. Uluslararası bir araştırma grubu olan Eurofever'ın verilerine göre ise, Avrupa toplumunda parsiyel kolşisin direnci %40 civarındadır (209). Kolşisine komplet direnç gösteren hastalar ise AAA hastalarının %10'unu oluşturmaktadır (210).

Hastaların %2-5 civarında bir kısmı ise gastrointestinal yakınmalar sebebiyle kolşisini tolere edememektedir (121). Bu hastalarda atakların başlama yaşı diğer hastalardan daha erkendir ve ataklar diğer hastalara göre daha ileri yaşlarda sonlanır. Ayrıca artrit, plöritik ataklar, transient mikroskobik hematüri ve proteinüri bulguları ataklar sırasında kolşisine dirençli hastalarda daha sıktır. Bu sebeple daha önceki çalışmalarda, ağır prognoz gösteren AAA hastalarında kolşisine direncin daha yüksek oran görülebileceği belirtilmiştir (210). M694V homozigot mutasyonunun renal amiloidozisle en çok ilişkili MEFV gen mutasyonu olmasıyla korele olarak, kolşisin direnci açısından da en önemli mutasyon olarak tanımlanmıştır (211).

Kolşisin direncinin etyolojisinde genetik faktörler, çevresel etkenler ve stres koşulları önemlidir; fakat yine de direncin fizyopatolojik mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Direnç faktörüne ek olarak, AAA hastalarında tedavi başarısının demografik faktörler, sosyoekonomik şartlar ve psikiyatrik dinamiklere bağlı olduğu düşünülmektedir. Özellikle psikiyatrik dinamiklere yönelik olarak yapılan bir araştırmada depresyonun kolşisin direncine zemin hazırlayan önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (210). Bu sebeple kolşisin dirençli hastalarda selektif seratonin reuptake inhibitörlerinin (SSRI) kullanılması gerektiği öne sürülmüştür. Fizyopatolojik olarak incelendiğinde kısırdöngü olarak AAA ataklarının ve inflamatuvar ağrıların depresyona sebep olduğu, depresyon varlığının da seratonerjik inflamatuvar kaskat aktivasyonu ile inflamasyonu arttırdığı bilinmektedir (212).

Depresyon ile takip edilen AAA hastalarında yapılan sitokin düzeyi ölçümlerinde IL-2, IL-12, IL-18 ve TNF- α düzeylerinin arttığı görülmüştür (213). Çalışmamıza dahil olan AAA hastaları arasında yapılan sorgulamada düzenli SSRI kullanan hastamız mevcut değildir. Bu sebeple çalışmamızda SSRI kullanımının hastalık prognozuna etkisi hakkında herhangi bir bulgu yoktur.

Psikiyatrik hastalıklarda görülen mtDNA kopya sayısı değişiklikleri ile ilgili olarak da farklı hastalık gruplarında farklı çalışmalar yapılmıştır. Majör depresyon ile takip edilen hastaların tükürük ve kanından yapılan araştırmalarda, bu hastalardaki mtDNA kopya sayısı kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur (214). Kronik strese maruz bırakılan farelerin dokularından yapılan analizlerde mtDNA kopya

sayısında artış tespit edilmiştir (214). Fizyopatolojisi açısından, mtDNA miktarındaki değişim, hipotalamik pitüiter aks üzerindeki hücreler arası iletişime ve kortikosteroid yollarına etki etmesinin depresyon gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir. Dışardan kortikosteroid verilen bireylerde de depresyon gelişiminin arttığı bilinen bir durumdur.

Majör depresyondan farklı olarak, yine sık görülen bir psikiyatrik hastalık olan bipolar duygulanım bozukluğu grubunda mtDNA kopya sayısı değişikliklerine yönelik olarak yapılan bir çalışmada anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (215). Ayrıca bipolar duygulanım bozukluğu olan hastalarda standart terapi olarak kullanılan lityum tedavisinin 6 haftalık düzenli sürdürülmesi sonrası ölçülen mtDNA kopya sayısı değişimlerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmada daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak hastaların yaş gruplarına göre mtDNA kopya sayıları arasında, yaş arttıkça mtDNA kopya sayılarında azalma yönünde benzerlik saptanmıştır (215). Bipolar duygulanım bozukluğu ve lityum kullanımının mtDNA kopya sayısına etkileri konusunda daha önce yapılan üç çalışmanın ikisinde aynı sonuç elde edilmiştir; fakat bir çalışmada bipolar duygulanım bozukluklu hastalardan postmortem beyin dokusundan izole edilen mtDNA'dan yapılan ölçümde, mtDNA kopya sayısında kontrol grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmiştir (216-218). Ayrıca bu hasta grubu ile ilgili olarak fizyopatolojide mitokondriyal disfonksiyonun da etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (219-221). Mitokondriyal disfonksiyonun oksidatif stresi arttırması sonucunda, ilk aşamada mtDNA kopya sayısının arttığı sonrasında da uzamış oksidatif hasara bağlı olarak da mtDNA kopya sayısını azalttığı gösterilmiştir (222, 223). Periferik kandaki mtDNA üzerinde çalışan araştırmacılar bipolar duygulanım bozukluğunda kopya sayısında fark bulamamalarını bu bilgiye dayandırmışlardır. Ancak hastalığın ilişkili olduğu dokudan alınan örneklerde yapılan çalışma bilimsel göstergelerle daha uyumlu sonuç vermiştir. Keza, lityum kullanımı ile ilgili olarak periferik kandan yapılan mtDNA ölçümlerinde anlamlı fark bulunmamasına rağmen, lityum verilen farelerin spinal kordlarından izole edilen mtDNA miktarında artış tespit edilmiştir (224). Buradan yola çıkarak mtDNA kopya sayısı değişikliklerinin araştırıldığı hastalık gruplarında, hastalık patolojisinin zeminini oluşturan dokudan alınan örneklerin analizinin,

sonuçların sağlığı açısından daha önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda AAA'nın kaynağı olarak görülen bağışıklık sistemi hücreleri olan lökositlerden elde edilen mtDNA'ların ölçümü sağlanarak, hastalıkla ilişkisiz dokulardan elde edilecek yanıltıcı sonuçlar ekarte edilmiştir.

Kolşisin dirençli hastaların tedavisi ile ilgili olarak daha önce anti-IL1 tedavileri denenmiştir. Etanercept ile yapılan bir çalışmada özellikle kronik artriti olan hastalarda atakların şiddeti ve sıklığında azalma sağladığı gösterilmiştir (225). Başka bir çalışmada ise anakinra başlanan hastalarda atakların azaldığı ve akut faz reaktanlarının normalize olduğu, ayrıca anakinranın yarılanma ömrünün diğer anti-IL1 moleküllere göre daha kısa olması sebebiyle kullanımının daha güvenli olduğu belirtilmiştir. Anakinraya cevap vermeyen hastalarda ise canakinumab kullanımı hastalık belirti ve bulgularının azalmasını sağlamıştır (226). Çalışmamıza katılan hastalar ise kolşisinden başka herhangi bir tedavi almamışlardır.

D vitamininin hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rolü olduğu bilinmektedir. Makrofajlar ve dentritik hücrelerin dahil olduğu birçok immün sistem hücresinde 25(OH)D-1 α hidroksilaz enziminin ekspresyon düzeyinin yüksek olması, D vitamininin hücre savunması açısından önemini göstermektedir. Üretilen 1,25(OH)₂D'nin otokrin veya parakrin yollarla antijen sunucu hücrelerin baskılanmasına, T hücre proliferasyonunun inhibe olmasına ve Th1 hücrelerinden üretilen IL-2, IFN γ ve TNF α sitokinlerinin azalmalarına sebep olduğu bilinmektedir. Bu sebeple de azalmış D vitamini düzeylerinin inflamasyon cevabında artışa neden olduğu iddia edilmektedir (227). Daha önce yapılan çalışmalarda D vitamini eksikliği ile otoimmün hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit, diyabet, birçok kanser türü ve kardiyak hastalıklar arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (228, 229). Ailevi Akdeniz ateşi hastaları ile sağlıklı kontroller arasında da D vitamini eksikliği açısından anlamlı fark bulunmakla birlikte; AAA hastaları içerisinde de kolşisine dirençli olan vakalarda, D vitamini düzeyi kolşisine duyarlı hastalardan daha düşük bulunmuştur (176, 230, 231). Bu değişken göz önünde bulundurularak D vitamini eksikliğinin, mtDNA kopya sayısı değişikliğinden bağımsız olarak hastalarda kolşisin direnci sonucunda artmış amiloidozis riskine sebep

olabileceğinden dolayı, çalışmaya şiddetli D vitamini eksikliği gösteren hastalar alınmamıştır.

Ailevi Akdeniz ateşi hastalarında atakların ve inflamasyonun baskılanmasının büyüme-gelişme parametreleri üzerine olumlu etkisi vardır. Kolşisin direnci olan hastaların tespitinde boy ve kilo persentillerinde düşüklük tanı kriterlerindendir; fakat çalışmamızda alınan hastalar 18 yaş üstü bireyler olduğu için hastalar büyüme-gelişme parametreleri açısından değerlendirilmemiştir (232).

Mitokondriyal disfonksiyon birçok kanser türünde önemli rol oynar (233, 234). Tümör gelişimi sırasında mitokondrinin normal fonksiyonlarında etkilenme meydana gelir. Birçok tümör türü, mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyonu baskılayarak, glikoliz yoluna ağırlık vererek laktat miktarını ve glikozun hücre içinde alımını artırır. Tümör dokusu hücrelerinin enerji üretimini ağırlıklı olarak glikoliz yolağıyla yapması “Warburg etkisi” olarak tanımlanmaktadır ve bu etki üzerinden klinik açıdan tümöral gelişimi takip eden PET (pozitron emisyon tomografi) görüntüleme yöntemi kullanılmaktadır (235). Mitokondriyal disfonksiyon sebebiyle oluşan reaktif oksijen radikalleri tümör metastazlarında önemli rol oynamaktadır (236). Mitokondriyal genomda ve çekirdek genomunda mitokondri metabolizmasını düzenleyen genlerde meydana gelen mutasyonlar da tümörögenezise zemin hazırlamaktadır (237).

Farklı tümör tiplerinde yapılan geniş tabanlı bir araştırmada, mtDNA kopya sayısı değişiklikleri ile ilgili şaşırtıcı bulgular elde edilmiştir (238). Çalışılan tümör tiplerinin yaklaşık yarısında normal dokuya göre mtDNA miktarında azalma tespit edilmiştir. Daha detaylı analizlerde, mtDNA miktarında azalma tespit edilen tümör tiplerinin bir kısmında da RNA sekanslama ile bakılan transkripsiyon düzeylerindeki ve immünohistokimya yöntemiyle bakılan protein düzeylerindeki azalma gösterilerek mitokondriye yerleşik metabolik yollarda yavaşlama yani mitokondriyal disfonksiyon ispat edilmiştir (238). Farklı tümör grupları arasında, farklı grupların yaptığı çalışmalarda mtDNA kopya sayısına ilişkin olarak artma ya da azalma yönünde değişken sonuçlar mevcuttur (239, 240). Bu değişkenliğin temelinde; incelenen tümör dokusunun sayısındaki yetersizlik, kontrol grubu olarak kullanılan

örneklerin uygun sayıda olmaması ve/veya kontrol grubunda kullanılan örneklerin uygun kriterlerde olmaması gösterilebilir. Bu uyumsuzluk kanserlerle ilgili yapılan bu geniş tabanlı araştırmada, kanser grubu açısından net olarak ortaya konmuş olsa da diğer hastalık grupları ve çalışma grupları açısından da aynı değişkenler sebebiyle farklı sonuçlar elde edilmesi mümkündür. Bu sebeple, özellikle mtDNA kopya sayısının birçok parametreden etkilendiği yapılan araştırmalarla ortaya konmakla birlikte, yapılan çalışmalarda çalışmaya alınan örnek kriterlerinin mtDNA kopya sayısını etkileyen durumları dışlayacak biçimde oluşturulması önerilmektedir. Bu bağlamda, mevcut çalışmamıza seçilen örneklerde daha önceki çalışmalarda belirlenmiş mtDNA kopya sayısını etkileyen parametrelere dikkat edilmiştir.

Apoptotik tümör hücrelerinde mtDNA kopya sayısının yüksek olduğu ve bu durumun tümör hücrelerinin apoptozise karşı korunmasında önemli olduğu gösterilmiştir. Apoptozise karşı direnç gelişmesinin neticesinde, tümör hücrelerinin kemoterapötiklere direnci artmaktadır. Tümör hücrelerinde azalmış mtDNA içeriği, reaktif oksijen radikallerinde artışa sebep olmaktadır. Reaktif oksijen radikallerinin artışı da antioksidan genlerin ekspresyonunda azalmaya sebep olarak, tümör hücrelerini kemoterapötiklere daha duyarlı hale getirmektedir. Bu sebeple, reaktif oksijen radikallerinin sentez yollarına etki edecek yeni moleküllerin kemoterapi duyarlılığını arttıracakları düşünülmektedir (241).

Yeni nesil dizileme ile ilgili gelişmeler de mtDNA kopya sayısı değişikliklerin daha geniş çapta araştırılmasına olanak tanımıştır. Yeni nesil dizileme tekniklerinin bize sunduğu önemli bir imkan olan tüm ekzom dizi analizi (whole exome sequencing-WES) genetik teknolojinin son dönemde geliştirdiği test panellerinden biridir. Bu test ile genomun ekzon denilen işlevsel bölgelerine ait DNA'da gerçekleşen değişiklikler belirlenebilmektedir.

Ekzom, vücudun fonksiyonu için gerekli olan proteinlerin üretimini sağlayan genlerin DNA dizilerinin bütünüdür. Bilimin bu zamana kadar belirleyebildiği hastalığa neden olan mutasyonların birçoğu DNA'nın ekzon bölgelerinde tespit edilmiştir. Son dönemlere kadar uygulanan genetik testlerin çoğu sadece tek bir geni

ya da hastalıkla ilgili olduğu düşünölen birkaç geni tararken, WES testleri binlerce geni eş zamanlı olarak taramaktadır.

Bu özellik, WES'i karmaşık genetik problemlerin sebeplerinin ortaya konulmasında en etkin yöntemlerden biri haline getirmektedir. Tüm ekzomların taranması yeni mutasyonların bulunması ve hastalığın atipik bulgularının belirlenmesi için idealdir. Ülkemizde sıklıkla akrabalıktan kaynaklanan ve Mendelyen hastalıklar olarak bilinen kondisyonların etmeni olan mutasyonların yaklaşık %85'i bu kodlanan ekzonların içindedir.

WES yöntemi kullanılarak geniş çalışma gruplarında yapılan ve mtDNA kopya sayısı değişimlerinin moleküler sebebinin araştırıldığı bir çalışmada heterozigot SLC25A4 gen mutasyonlarının mtDNA miktarında azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (242).

Görüldüğü üzere, mtDNA kopya sayısı değişikliklerinin birçok hastalık ve durum için biyobelirteç olarak kullanılma imkanı vardır. Bu çalışmada AAA hastalığının Dünya'da en sık görüldüğü yerlerden biri olan ülkemizde tanı, takip, tedavi başarısı ve hastalığın en önemli komplikasyonu olan kronik böbrek yetmezliği riskinin belirlenmesi için mtDNA kopya sayısı miktarının risk unsuru olarak kullanılarak, AAA açısından morbidite oranlarının düşürölmesi önerilmiştir. Yine AAA hastaları içerisinde, mtDNA kopya sayısı değişiklikleri ile ilgili olarak farklı hasta grupları ile yapılacak olan genişletilmiş çalışmalar, hastalığın moleküler mekanizmasını aydınlatılması ve mitokondri disfonksiyonunun AAA'ya etkisinin tam olarak anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial mediterranean fever. The Lancet. 1998;351(9103):659-64.
2. Fujikura K. Global epidemiology of Familial Mediterranean fever mutations using population exome sequences. Molecular genetics & genomic medicine. 2015;3(4):272-82.
3. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, et al. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. European journal of human genetics. 2001;9(7):553-5.
4. Consortium FF. A candidate gene for familial Mediterranean fever. Nature genetics. 1997;17(1):25.
5. Consortium IF. 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.
6. Murat A, Anil AB, Ertaner D, Alkan B, YAVAŞCAN Ö, Nejat A, et al. The Effect of M694V Mutation on Clinical Presentation and Acute Phase Response in Children with Familial Mediterranean Fever: Single Center Experience in Western Turkey. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 2011;31(6):1410-7.
7. Soylemezoglu O, Kandur Y, Duzova A, Ozkaya O, Kasapcopur O, Baskin E, et al. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: comparison of rare and common mutations in a Turkish paediatric cohort. Clinical and experimental rheumatology. 2014;33(6 Suppl 94):152-5.
8. Coşku S, Kurtgöz S, Keskin E, Sönmez F, Bozkurt G. Frequency of mutations in Mediterranean fever gene, with gender and genotype–phenotype correlations in a Turkish population. Journal of genetics. 2015;94(4):629-35.
9. Hababbeh LA, al Hiary M, Al Zaben SF, Al-Momani A, Khasawneh R, abu Mallouh M, et al. Genetic profile of patients with familial Mediterranean fever (FMF): single center experience at King Hussein Medical Center (KHMC). Medical Archives. 2015;69(6):417.

10. Giancane G, Ter Haar NM, Wulffraat N, Vastert SJ, Barron K, Hentgen V, et al. Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015;74(4):635-41.
11. Smith A, Staden R, Young I. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-65.
12. Pikó L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Developmental biology*. 1987;123(2):364-74.
13. Lee H-T, Lin C-S, Chen W-S, Liao H-T, Tsai C-Y, Wei Y-H. Leukocyte mitochondrial DNA alteration in systemic lupus erythematosus and its relevance to the susceptibility to lupus nephritis. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(7):8853-68.
14. Chen S, Li Z, He Y, Zhang F, Li H, Liao Y, et al. Elevated mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells is associated with childhood autism. *BMC psychiatry*. 2015;15(1):1.
15. Liu CS, Kuo CL, Cheng WL, Huang CS, Lee CF, Wei YH. Alteration of the copy number of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with hyperlipidemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1042(1):70-5.
16. Lemnrau A, Brook MN, Fletcher O, Coulson P, Tomczyk K, Jones M, et al. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells and risk of developing breast cancer. *Cancer research*. 2015;75(14):2844-50.
17. Tunca M, Akar S, Soy Turk M, Kirkali G, Resmi H, Akhunlar H, et al. The effect of interferon alpha administration on acute attacks of familial Mediterranean fever: a double-blind, placebo-controlled trial. *Clinical and experimental rheumatology*. 2004;22:S37-S40.
18. Group TFS. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine*. 2005;84(1):1-11.
19. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever: a survey of 470 cases and review of the literature. *The American journal of medicine*. 1967;43(2):227-53.

20. Yıldız Ç. Homozigot E148q Varyantına Sahip Ailevi Akdeniz Ateşi Vakalarında ve Sağlıklı Toplumda DNA MEFV (Mediterranean Fever) Gen Analizi ve E148q Allel Sıklığının Taranması. 2013.
21. Janeway TC, Mosenthal H. An unusual paroxysmal syndrome, probably allied to recurrent vomiting: with a study of the nitrogen metabolism. *Archives of Internal Medicine*. 1908;2(3):214-25.
22. Siegal S. Benign paroxysmal peritonitis. *Annals of internal medicine*. 1945;23(1):1-21.
23. Reimann HA. Periodic disease: a probable syndrome including periodic fever, benign paroxysmal peritonitis, cyclic neutropenia and intermittent arthralgia. *Journal of the American Medical Association*. 1948;136(4):239-44.
24. Mamou H. La maladie périodique: Expansion scientifique française; 1956.
25. Heller H, Sohar E, Sherf L. Familial mediterranean fever. *AMA archives of internal medicine*. 1958;102(1):50-71.
26. Marmaralı A. Garip bir karın ağrısı sendromu. *Türk Tıp Cem Mec*. 1946(12).
27. Tidow N, Chen X, Müller C, Kawano S, Gombart AF, Fischel-Ghodsian N, et al. Hematopoietic-specific expression of MEFV, the gene mutated in familial Mediterranean fever, and subcellular localization of its corresponding protein, pyrin. *Blood*. 2000;95(4):1451-5.
28. Matzner Y, Abedat S, Shapiro E, Eisenberg S, Bar-Gil-Shitrit A, Stepensky P, et al. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood*. 2000;96(2):727-31.
29. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever *Arthritis Rheum* 1997 40. N.
30. Pras M. Amyloidosis of familial Mediterranean fever and the MEFV gene. *Amyloid*. 2000;7(4):289-93.
31. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *British journal of haematology*. 2009;146(5):467-78.
32. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, et al. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates

- ASC-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(42):39320-9.
33. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular cell*. 2002;10(2):417-26.
 34. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004;20(3):319-25.
 35. 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 β production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(26):9982-7.
 36. Papin S, Cuenin S, Agostini L, Martinon F, Werner S, Beer H, 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 & Differentiation*. 2007;14(8):1457-66.
 37. Seshadri S, Duncan MD, Hart JM, Gavrilin MA, Wewers MD. Pyrin levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1 β processing and release. *The Journal of Immunology*. 2007;179(2):1274-81.
 38. Yu J-W, Fernandes-Alnemri T, Datta P, Wu J, Juliana C, Solorzano L, et al. Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Molecular cell*. 2007;28(2):214-27.
 39. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular cell*. 2003;11(3):591-604.
 40. Matzner Y, Partridge R, Levy M, Babior BM. Diminished activity of a chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with familial Mediterranean fever. *Blood*. 1984;63(3):629-33.
 41. Matzner Y, Brzezinski A. C5a-inhibitor deficiency in peritoneal fluids from patients with familial Mediterranean fever. *New England Journal of Medicine*. 1984;311(5):287-90.

42. <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/search.php?n=1>.
43. Özen S. Changing concepts in familial mediterranean fever: Is it possible to have an autosomal-recessive disease with only one mutation? *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(6):1575-7.
44. Ting JP-Y, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(3):183-95.
45. Shohat M, Livneh A, Zemer D, Pras M, Sohar E. Twin studies in familial Mediterranean fever. *American journal of medical genetics*. 1992;44(2):179-82.
46. Rogers DB, Shohat M, Petersen GM, Bickal J, Congleton J, Schwabe AD, et al. Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *American journal of medical genetics*. 1989;34(2):168-72.
47. Yuval Y, Hemo-Zisser M, Zemer D, Sohar E, Pras M. Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever (FMF). *American journal of medical genetics*. 1995;57(3):455-7.
48. Tamir N, Langevitz P, Zemer D, Pras E, Shinar Y, Padeh S, et al. Late-onset familial Mediterranean fever (FMF): A subset with distinct clinical, demographic, and molecular genetic characteristics. *American journal of medical genetics*. 1999;87(1):30-5.
49. Paut IK, Dubuc M, Sportouch J, Minodier P, Garnier J, Touitou I. Phenotype–genotype correlation in 91 patients with familial Mediterranean fever reveals a high frequency of cutaneomucous features. *Rheumatology*. 2000;39(11):1275-9.
50. Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, Dagan T, Mimouni A, et al. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *European Journal of Human Genetics*. 1999;7(3):287-92.
51. Langevitz P, Livneh A, Padeh S, Zaks N, Shinar Y, Zemer D, et al. Familial Mediterranean fever: new aspects and prospects at the end of the millenium. *The Israel Medical Association journal: IMAJ*. 1999;1(1):31-6.

52. Pras M. Familial Mediterranean Fever: From the Clinical Syndrome to the Cloning of the Pyrin Gene: EDITORIAL REVIEW. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1998;27(2):92-7.
53. Livneh A, Langevitz P. Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2000;14(3):477-98.
54. Livnehneh A, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Migdal A, Sohar E, et al., editors. *The changing face of familial Mediterranean fever. Seminars in arthritis and rheumatism*; 1996: Elsevier.
55. Vogel Y, Büchner N, Haverkamp T, Henning B. [Familial Mediterranean fever. Rare manifestation without fever and with inconspicuous family case history]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2008;133(31-32):1621-4.
56. Yoldaş TÇ, Çakar N, Başaran Ö, Acar B, Uncu N, Çaycı FŞ. The effect of colchicine and disease severity on physical growth in children with familial Mediterranean fever. *Clinical rheumatology*. 2016;35(6):1603-7.
57. Yolbas I, Ozen F, Kocak N, Kelekci S, Gunes A, Yel S. The frequency of MEFV gene mutation in patients admitted to hospital with preliminary diagnosis of familial mediterranean fever who undergone a prior appendectomy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16(7):949-51.
58. Polat A, Acikel C, Sozeri B, Dursun I, Kasapcopur O, Gulez N, et al. Comparison of the efficacy of once-and twice-daily colchicine dosage in pediatric patients with familial Mediterranean fever—a randomized controlled noninferiority trial. *Arthritis research & therapy*. 2016;18(1):1.
59. Fonnesu C, Cerquaglia C, Giovinale M, Curigliano V, Verrecchia E, de Socio G, et al. Familial Mediterranean Fever: a review for clinical management. *Joint Bone Spine*. 2009;76(3):227-33.
60. Aharoni D, Hiller N, Hadas-Halpern I. Familial Mediterranean fever: abdominal imaging findings in 139 patients and review of the literature. *Abdominal imaging*. 2000;25(3):297-300.

61. Vural B, Cantürk NZ, Esen N, Solakoglu S, Cantürk Z, Kirkali G, et al. The role of neutrophils in the formation of peritoneal adhesions. *Human reproduction*. 1999;14(1):49-54.
62. Berkun Y, Ben-Chetrit E, Klar A, Ben-Chetrit E, editors. *Peritoneal adhesions and intestinal obstructions in patients with familial Mediterranean fever—are they more frequent? Seminars in arthritis and rheumatism*; 2007: Elsevier.
63. Kilic A, Varkal MA, Durmus MS, Yildiz I, Yıldırım ZNY, Turunc G, et al. Relationship between clinical findings and genetic mutations in patients with familial Mediterranean fever. *Pediatric Rheumatology*. 2015;13(1):1.
64. Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, Ben-Chetrit E, Cattani D, Bernot A, et al. Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *European Journal of human genetics*. 1998;6(1):95-7.
65. Sánchez FF, Martínez VM, Fernández BA, Martín dLI, Paya EI, editors. [Cardiac tamponade as first manifestation in Mediterranean fever with autosomal dominant form]. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain)*; 2003; 2015.
66. Yoshioka K, Furumitsu Y, Sano T, Miyamoto T, Agematsu K. Acute Pericarditis as the First Manifestation of Familial Mediterranean Fever: A Possible Relationship with Idiopathic Recurrent Pericarditis. *Internal Medicine*. 2014;53(15):1659-63.
67. Kees S, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Pras M, Linveh A. Attacks of pericarditis as a manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). *QJM*. 1997;90(10):643-7.
68. Yalcinkaya F, Tekin M, Tümer N, Ozkaya N. Protracted arthritis of familial Mediterranean fever (an unusual complication). *Rheumatology*. 1997;36(11):1228-30.
69. Uthman I, Hajj-Ali RA, Arayssi T, Masri A-F, Nasr F. Arthritis in familial Mediterranean fever. *Rheumatology international*. 2001;20(4):145-8.
70. Sneh E, Pras M, Michaeli D, Shahin N, Gafni J. Protracted arthritis in familial Mediterranean fever. *Rheumatology*. 1977;16(2):102-6.

71. Lidar M, Kedem R, Mor A, Levartovsky D, Langevitz P, Livneh A. Arthritis as the sole episodic manifestation of familial Mediterranean fever. *The Journal of rheumatology*. 2005;32(5):859-62.
72. Ertekin V, Selimoğlu MA, Pirim I. Familial Mediterranean fever in a childhood population in eastern Turkey. *Pediatrics international*. 2005;47(6):640-4.
73. Garcia-Gonzalez A, Weisman MH, editors. *The arthritis of familial Mediterranean fever*. Seminars in arthritis and rheumatism; 1992: Elsevier.
74. Gedalia A, Adar A, Gorodischer R. Familial Mediterranean fever in children. *The Journal of rheumatology Supplement*. 1992;35:1.
75. Majeed H, Rawashdeh M. The clinical patterns of arthritis in children with familial Mediterranean fever. *Qjm*. 1997;90(1):37-43.
76. İnce E, Çakar N, Tekin M, Kendirli T, Özkaya N, Akar N, et al. Arthritis in children with familial Mediterranean fever. *Rheumatology international*. 2002;21(6):213-7.
77. Langevitz P, Livneh A, Zemer D, Shemer J, Pras M, editors. *Seronegative spondyloarthropathy in familial Mediterranean fever*. Seminars in arthritis and rheumatism; 1997: Elsevier.
78. Majeed HA, Al-Qudah AK, Qubain H, Shahin HM, editors. *The clinical patterns of myalgia in children with familial Mediterranean fever*. Seminars in arthritis and rheumatism; 2000: Elsevier.
79. Alayli G, Durmus D, Ozkaya O, Sen H, Genc G, Kuru O. Frequency of juvenile fibromyalgia syndrome in children with familial Mediterranean fever: effects on depression and quality of life. *Clinical and experimental rheumatology*. 2010;29(6 Suppl 69):S127-32.
80. Langevitz P, Buskila D, Finkelstein R, Zaks N, Neuman L, Sukenik S, et al. Fibromyalgia in familial Mediterranean fever. *The Journal of rheumatology*. 1994;21(7):1335-7.
81. Sayarlioglu M, Sayarlioglu H, Ozen S, Erkoc R, Gul A. Colchicine-induced myopathy in a teenager with familial Mediterranean fever. *Annals of Pharmacotherapy*. 2003;37(12):1821-4.

82. Odabas AR, Cetinkaya R, Selcuk Y, Bilen H. Familial Mediterranean fever. Southern medical journal. 2002;95(12):1400-4.
83. Langevitz P, Zemer D, Livneh A, Shemer J, Pras M. Protracted febrile myalgia in patients with familial Mediterranean fever. The Journal of rheumatology. 1994;21(9):1708-9.
84. Sidi G, Shinar Y, Livneh A, Langevitz P, Pras M, Pras E. Protracted febrile myalgia of familial Mediterranean fever: mutation analysis and clinical correlations. Scandinavian journal of rheumatology. 2000;29(3):174-6.
85. Barzilai A, Langevitz P, Goldberg I, Kopolovic J, Livneh A, Pras M, et al. Erysipelas-like erythema of familial Mediterranean fever: clinicopathologic correlation. Journal of the American Academy of Dermatology. 2000;42(5):791-5.
86. Lachmann H. Clinical immunology review series: an approach to the patient with a periodic fever syndrome. Clinical & Experimental Immunology. 2011;165(3):301-9.
87. Akman-Demir G, Gul A, Gurol E, Ozdogan H, Bahar S, Oge AE, et al. Inflammatory/demyelinating central nervous system involvement in familial Mediterranean fever (FMF): coincidence or association? Journal of neurology. 2006;253(7):928-34.
88. Yahalom G, Kivity S, Lidar M, Vaknin-Dembinsky A, Karussis D, Flechter S, et al. Familial Mediterranean fever (FMF) and multiple sclerosis: an association study in one of the world's largest FMF cohorts. European Journal of Neurology. 2011;18(9):1146-50.
89. Akalin T, Demirağ M, Tezcan M, Öztürk M. Scleritis and sudden hearing loss associated with familial Mediterranean fever. Clinical & Experimental Rheumatology. 2010;28(4):S103.
90. Berestizschevsky S, Weinberger D, Avisar I, Avisar R. Episcleritis associated with familial Mediterranean fever. The Israel Medical Association journal: IMAJ. 2008;10(4):318-9.
91. Yazici H, Pazarli H. Eye involvement in a patient with familial Mediterranean fever. The Journal of rheumatology. 1982;9(4):644.

92. Obici L, Merlini G. Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. *Autoimmunity reviews*. 2012;12(1):14-7.
93. Van der Hilst J, Simon A, Drenth J. Hereditary periodic fever and reactive amyloidosis. *Clinical and experimental medicine*. 2005;5(3):87-98.
94. Gafni J, Ravid M, Sohar E. The role of amyloidosis in familial mediterranean fever. A population study. *Israel journal of medical sciences*. 1968;4(5):995.
95. Kasifoglu T, Bilge SY, Sari I, Solmaz D, Senel S, Emmungil H, et al. Amyloidosis and its related factors in Turkish patients with familial Mediterranean fever: a multicentre study. *Rheumatology*. 2013;ket400.
96. Akpolat T, Özkaya O, Özen S. Homozygous M694V as a risk factor for amyloidosis in Turkish FMF patients. *Gene*. 2012;492(1):285-9.
97. Saatçi Ü, Ozen S, Özdemir S, Bakkaloglu A, Besbas N, Topaloglu R, et al. Familial Mediterranean fever in children: report of a large series and discussion of the risk and prognostic factors of amyloidosis. *European journal of pediatrics*. 1997;156(8):619-23.
98. http://www.askjpc.org/wsc/wsc_showcase2.php?id=555.
99. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, et al. Familial Mediterranean Fever at the Millennium Clinical Spectrum, Ancient Mutations, and a Survey of 100 American Referrals to the National Institutes of Health. *Medicine*. 1998;77(4):268-97.
100. Tishler M, Pras M, Yaron M. Abdominal fat tissue aspirate in amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Clinical and experimental rheumatology*. 1987;6(4):395-7.
101. Sungur C, Sungur A, Ruacan S, Arik N, Yasavul U, Turgan C, et al. Diagnostic value of bone marrow biopsy in patients with renal disease secondary to familial Mediterranean fever. *Kidney international*. 1993;44(4):834-6.
102. Aksu K, Keser G. Coexistence of vasculitides with familial Mediterranean fever. *Rheumatology international*. 2011;31(10):1263-74.
103. Ozen S, Ben-Chetrit E, Bakkaloglu A, Gur H, Tinaztepe K, Calguneri M, et al., editors. *Polyarteritis nodosa in patients with Familial Mediterranean Fever (FMF): a concomitant disease or a feature of FMF? Seminars in arthritis and rheumatism*; 2001: Elsevier.

104. Hatemi G, Masatlioglu S, Gogus F, Ozdogan H. Necrotizing vasculitis associated with familial Mediterranean fever. *The American journal of medicine*. 2004;117(7):516-9.
105. Ozdogan H, Arisoy N, Kasapcapur O, Sever L, Calışkan S, Tuzuner N, et al. Vasculitis in familial Mediterranean fever. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(2):323-7.
106. Davatchi F, Shahram F, Chams-Davatchi C, Shams H, Nadji A, Akhlaghi M, et al. Behcet's disease: from East to West. *Clinical rheumatology*. 2010;29(8):823-33.
107. Korkmaz C, Özdoğan H, Kasapçopur Ö, Yazici H. Acute phase response in familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases*. 2002;61(1):79-81.
108. Duzova A, Bakkaloglu A, Besbas N, Topaloglu R, Ozen S, Ozaltin F, et al. Role of A-SAA in monitoring subclinical inflammation and in colchicine dosage in familial Mediterranean fever. *Clinical and experimental rheumatology*. 2003;21(4):509-14.
109. Tunca M, Kirkali G, Soytürk M, Akar S, Pepys MB, Hawkins PN. Acute phase response and evolution of familial Mediterranean fever. *The Lancet*. 1999;353(9162):1415.
110. Öktem S, Yavuzsen T, Sengül B, Akhunlar H, Akar S, Tunca M. Levels of interleukin-6 (IL-6) and its soluble receptor (sIL-6R) in familial Mediterranean fever (FMF) patients and their first degree relatives. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(34):S34-S6.
111. Manukyan G, Ghazaryan K, Ktsoyan ZA, Tatyán M, Khachatryan Z, Hakobyan G, et al. Cytokine profile of Armenian patients with familial Mediterranean fever. *Clinical biochemistry*. 2008;41(10):920-2.
112. Ceri M, Unverdi S, Altay M, Üreten K, Öztürk M, Gönen N, et al. Anti-cyclic citrullinated peptides positivity rate in patients with familial Mediterranean fever. *Clinical & Experimental Rheumatology*. 2010;28(4):S58.
113. Guler E, Kaptanoglu E, Sahin O, Candan F, Hayta E, Elden H. Autoantibodies are not associated with familial mediterranean fever. *Acta Reumatológica Portuguesa*. 2012;37(2):144-8.

114. Sever F, Sever M, Sanal S, Yalçın M, Berdeli A. Yalnız pulmoner bulguları olan ailesel Akdeniz ateşi; genetik analizle erken tanı. *Tuberk Toraks*. 2012;60(4):380-4.
115. Dinarello CA, Wolfe SM, Goldfinger SE, Dale DC, Alling DW. Colchicine therapy for familial Mediterranean fever: a double-blind trial. *New England Journal of Medicine*. 1974;291(18):934-7.
116. 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. *New England Journal of Medicine*. 1974;291(18):932-4.
117. Ozturk M, Kanbay M, Kasapoglu B, Onat A, Guz G, Furst D, et al. Therapeutic approach to familial Mediterranean fever: a review update. *Clinical and experimental rheumatology*. 2010;29(4 Suppl 67):S77-86.
118. Majeed H, Barakat M. Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in children: analysis of 88 cases. *European journal of pediatrics*. 1989;148(7):636-41.
119. Zemer D, Livneh A, Danon YL, Pras M, Sohar E. Long-term colchicine treatment in children with familial mediterranean fever. *Arthritis & Rheumatism*. 1991;34(8):973-7.
120. Ben-Chetrit E, Ozdogan H. Non-response to colchicine in FMF--definition, causes and suggested solutions. *Clinical and experimental rheumatology*. 2007;26(4 Suppl 50):S49-51.
121. Kallinich T, Haffner D, Niehues T, Huss K, Lainka E, Neudorf U, et al. Colchicine use in children and adolescents with familial Mediterranean fever: literature review and consensus statement. *Pediatrics*. 2007;119(2):e474-e83.
122. Livneh A, Zemer D, Langevitz P, Laor A, Sohar E, Pras M. Colchicine treatment of AA amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis & Rheumatism*. 1994;37(12):1804-11.
123. Zemer D. Reversal of the nephrotic syndrome by colchicine in amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Ann Intern Med*. 1992;116:426.
124. Erken E, Ozer HT, Bozkurt B, Gunesacar R, Erken EG, Dinkci S. Early suppression of familial Mediterranean fever attacks by single medium dose methyl-prednisolone infusion. *Joint Bone Spine*. 2008;75(3):370-2.

125. Özen S, Bilginer Y, Ayaz NA, Calguneri M. Anti-interleukin 1 treatment for patients with familial Mediterranean fever resistant to colchicine. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(3):516-8.
126. Meinzer U, Quartier P, Alexandra J-F, Hentgen V, Retornaz F, Koné-Paut I, editors. *Interleukin-1 targeting drugs in familial Mediterranean fever: a case series and a review of the literature*. *Seminars in arthritis and rheumatism*; 2011: Elsevier.
127. Hashkes PJ, Spalding SJ, Giannini EH, Huang B, Johnson A, Park G, et al. Rilonacept for colchicine-resistant or-intolerant familial Mediterranean fever: a randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2012;157(8):533-41.
128. Ozgocmen S, Akgul O. Anti-TNF agents in familial Mediterranean fever: report of three cases and review of the literature. *Modern Rheumatology*. 2011;21(6):684-90.
129. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annual review of cell biology*. 1988;4(1):289-331.
130. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clinical and Translational Medicine*. 2016;5(1):1.
131. Wallace DC. Mitochondria as chi. *Genetics*. 2008;179(2):727-35.
132. Herrmann JM, Neupert W. Protein transport into mitochondria. *Current opinion in microbiology*. 2000;3(2):210-4.
133. www.khanacademy.org. [Available from: www.khanacademy.org].
134. Weitzman P, editor *Krebs citric acid cycle: half a century and still turning*. *Biochem Soc Symp*.
135. http://chem.libretexts.org/Core/BiologicalChemistry/Metabolism/Kreb's_Cycle.
136. Mayes PA, Botham KM. The respiratory chain & oxidative phosphorylation. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 2003:92.
137. Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2003;74(9):1188-99.
138. Tyler DD. *The mitochondrion in health and disease*: VCH New York; 1992.

139. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16(9):530-42.
140. Saudubray J-M, Van den Berghe G, Walter JH. *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*: Springer Science & Business Media; 2011.
141. Schapira AH. Mitochondrial disease. *The Lancet*. 2006;368(9529):70-82.
142. Pon LA, Vestweber D, Yang M, Schatz G. Interaction between mitochondria and the nucleus. *J Cell Sci*. 1989;1989(Supplement 11):1-11.
143. Schapira A, Cock H. Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *European journal of clinical investigation*. 1999;29(10):886-98.
144. McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. The neurology of mitochondrial DNA disease. *The Lancet Neurology*. 2002;1(6):343-51.
145. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences*. 1980;77(11):6715-9.
146. Thorburn DR, Dahl HHM. Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *American journal of medical genetics*. 2001;106(1):102-14.
147. Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 1999;238(1):211-30.
148. Chaturvedi S, Bala K, Thakur R, Suri V. Mitochondrial encephalomyopathies: advances in understanding. *Medical science monitor*. 2005;11(7):RA238-RA46.
149. Johns DR. Mitochondrial DNA and disease. *New England journal of medicine*. 1995;333(10):638-44.
150. Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(35):25791-802.
151. Iborra FJ, Kimura H, Cook PR. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC biology*. 2004;2(1):1.

152. Bogenhagen D, Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*. 1977;11(4):719-27.
153. Birky Jr CW. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual review of genetics*. 2001;35(1):125-48.
154. Saudubray J-MB, Walter G, John H, Saudubray GB, Walter JH. Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment. SpringerLink (Online service); 2012. Report No.: 3642157203.
155. Olson MW, Wang Y, Elder RH, Kaguni LS. Subunit Structure of Mitochondrial DNA Polymerase from Drosophila Embryos PHYSICAL AND IMMUNOLOGICAL STUDIES. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(48):28932-7.
156. Fan L, Sanschagrin PC, Kaguni LS, Kuhn LA. The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(17):9527-32.
157. Lim SE, Longley MJ, Copeland WC. The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase γ enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(53):38197-203.
158. Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Human molecular genetics*. 2004;13(9):935-44.
159. Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(4):1309-13.
160. Gérard M-A, Krol A, Carbon P. Transcription factor hStaf/ZNF143 is required for expression of the human TFAM gene. *Gene*. 2007;401(1):145-53.

161. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829-39.
162. Weitzel JM, Iwen KAH, Seitz HJ. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Experimental physiology*. 2003;88(01):121-8.
163. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. 2003;299(5608):896-9.
164. Clayton D. Structure and function of the mitochondrial genome. *Journal of inherited metabolic disease*. 1992;15(4):439-47.
165. Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled leading-and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*. 2000;100(5):515-24.
166. Litoshenko A. [Renewal of mitochondrial DNA in the liver of rats of different ages]. *Biulleten'eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 1984;97(3):299-301.
167. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000;25(2):169-93.
168. Cacherill FR U, J.R. *Methods and Applications*. Germany: Heidelberg; 2001.
169. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K-I. *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*: Springer Science & Business Media; 2012.
170. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *Journal of virological methods*. 1999;77(1):37-46.
171. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology*. 1996;14(3):303-8.
172. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997;22(1):130-9.
173. Caplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT. LightCycler hybridization probes. *Biochemica*. 1999;1:5-8.

174. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 2006;27(2):95-125.
175. Van der Velden V, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, Van Dongen J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003;17(6):1013-34.
176. Erten Ş, Altunoğlu A, Ceylan GG, Maraş Y, Koca C, Yüksel A. Low plasma vitamin D levels in patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatology international*. 2012;32(12):3845-9.
177. Shen M, Zhang L, Bonner MR, Liu CS, Li G, Vermeulen R, et al. Association between mitochondrial DNA copy number, blood cell counts, and occupational benzene exposure. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2008;49(6):453-7.
178. Tan D, Goerlitz DS, Dumitrescu RG, Han D, Seillier-Moiseiwitsch F, Spornak SM, et al. Associations between cigarette smoking and mitochondrial DNA abnormalities in buccal cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(6):1170-7.
179. Bonner MR, Shen M, Liu C-S, DiVita M, He X, Lan Q. Mitochondrial DNA content and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung cancer*. 2009;63(3):331-4.
180. Hosgood HD, Liu C-S, Rothman N, Weinstein SJ, Bonner MR, Shen M, et al. Mitochondrial DNA copy number and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*. 2010;31(5):847-9.
181. Pohjoismäki JL, Goffart S, Taylor RW, Turnbull DM, Suomalainen A, Jacobs HT, et al. Developmental and pathological changes in the human cardiac muscle mitochondrial DNA organization, replication and copy number. *PLoS One*. 2010;5(5):e10426.
182. Kim M-Y, Lee J-W, Kang H-C, Kim E, Lee D-C. Leukocyte mitochondrial DNA (mtDNA) content is associated with depression in old women. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2011;53(2):e218-e21.
183. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(3):205-14.

184. Baloyannis SJ. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*. 2006;9(2):119-26.
185. Leterrier J, Rusakov D, Nelson B, Linden M. Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: Evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro. *Microscopy research and technique*. 1994;27(3):233-61.
186. Oliveira G, Diogo L, Grazina M, Garcia P, Ataide A, Marques C, et al. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a population-based study. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2005;47(03):185-9.
187. Rossignol D, Frye R. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Molecular psychiatry*. 2012;17(3):290-314.
188. Gu F, Chauhan V, Kaur K, Brown W, LaFauci G, Wegiel J, et al. Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Translational psychiatry*. 2013;3(9):e299.
189. Petersen MH, Budtz-Jørgensen E, Sørensen SA, Nielsen JE, Hjermand LE, Vinther-Jensen T, et al. Reduction in mitochondrial DNA copy number in peripheral leukocytes after onset of Huntington's disease. *Mitochondrion*. 2014;17:14-21.
190. Pyle A, Anugraha H, Kurzawa-Akanbi M, Yarnall A, Burn D, Hudson G. Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*. 2016;38:216. e7-. e10.
191. Lacedonia D, Carpagnano GE, Crisetti E, Cotugno G, Palladino GP, Patricelli G, et al. Mitochondrial DNA alteration in obstructive sleep apnea. *Respiratory research*. 2015;16(1):1.
192. Che R, Yuan Y, Huang S, Zhang A. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014;306(4):F367-F78.
193. Park KS, Song JH, Lee K-U, Choi CS, Koh JJ, Shin CS, et al. Peripheral blood mitochondrial DNA content correlates with lipid oxidation rate during

- euglycemic clamps in healthy young men. *Diabetes research and clinical practice*. 1999;46(2):149-54.
194. Park K-S, Nam K-J, Kim J-W, Lee Y-B, Han C-Y, Jeong J-K, et al. Depletion of mitochondrial DNA alters glucose metabolism in SK-Hep1 cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2001;280(6):E1007-E114.
 195. Lee S-H, Chung D-J, Lee H-S, Kim T-J, Kim M-H, Jeong HJ, et al. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood in polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2011;60(12):1677-82.
 196. Tin A, Grams ME, Ashar FN, Lane JA, Rosenberg AZ, Grove ML, et al. Association between Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood and Incident CKD in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2016:ASN. 2015060661.
 197. Abu-Amero KK, Azad TA, Kalantan H, Sultan T, Al-Muammar AM. Mitochondrial Sequence Changes in Keratoconus Patients Screening Mitochondrial Genome in Keratoconus Patients. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(3):1706-10.
 198. Abu-Amero K, Kondkar AA, Azad TA, Sultan T, Kalantan H, Al-Muammar AM. Keratoconus is associated with increased copy number of mitochondrial DNA. 2014.
 199. Reynier P, May-Panloup P, Chretien M, Morgan C, Jean M, Savagner F, et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Molecular human reproduction*. 2001;7(5):425-9.
 200. Larsson N-G, Oldfors A, Garman JD, Barsh GS, Clayton DA. Down-regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. *Human molecular genetics*. 1997;6(2):185-1991.
 201. Hecht NB, Liem H, Kleene KC, Distel RJ, Ho S-m. Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA. *Developmental biology*. 1984;102(2):452-61.
 202. Shitara H, Kaneda H, Sato A, Inoue K, Ogura A, Yonekawa H, et al. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs

- from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics*. 2000;156(3):1277-84.
203. Sutovsky P, Tengowski MW, Navara CS, Zoran SS, Schatten G. Mitochondrial sheath movement and detachment in mammalian, but not nonmammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. *Molecular reproduction and development*. 1997;47(1):79-86.
 204. May-Panloup P, Chrétien MF, Savagner F, Vasseur C, Jean M, Malthiery Y, et al. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction*. 2003;18(3):550-6.
 205. Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biology of reproduction*. 2010;83(1):52-62.
 206. Pagano G, Castello G, Pallardó FV. Sjögren's syndrome-associated oxidative stress and mitochondrial dysfunction: prospects for chemoprevention trials. *Free radical research*. 2013;47(2):71-3.
 207. Valcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, et al. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology*. 2014:keu016.
 208. Twig G, Livneh A, Vivante A, Afek A, Shamiss A, Derazne E, et al. Mortality risk factors associated with familial Mediterranean fever among a cohort of 1.25 million adolescents. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;73(4):704-9.
 209. Ter Haar N, Lachmann H, Özen S, Woo P, Uziel Y, Modesto C, et al. Treatment of autoinflammatory diseases: results from the Eurofever Registry and a literature review. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012:annrheumdis-2011-201268.
 210. Cetin GY, Balkarli A, Öksüz AN, Kimyon G, Pehlivan Y, Orhan O, et al. Evaluation of frequency and the attacks features of patients with colchicine resistance in FMF. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2014;54(5):356-9.
 211. Soylemezoglu O, Arga M, Fidan K, Gonen S, Emeksiz HC, Hasanoglu E, et al. Unresponsiveness to colchicine therapy in patients with familial Mediterranean

- fever homozygous for the M694V mutation. *The Journal of rheumatology*. 2010;37(1):182-9.
212. Onat AM, Öztürk MA, Özçakar L, Üreten K, Kaymak SU, Kiraz S, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors reduce the attack frequency in familial Mediterranean fever. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2007;211(1):9-14.
 213. Sutçigil L, Oktenli C, Musabak U, Bozkurt A, Cansever A, Uzun O, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clinical and Developmental Immunology*. 2008;2007.
 214. Cai N, Chang S, Li Y, Li Q, Hu J, Liang J, et al. Molecular signatures of major depression. *Current Biology*. 2015;25(9):1146-56.
 215. de Sousa RT, Uno M, Zanetti MV, Shinjo SM, Busatto GF, Gattaz WF, et al. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2014;48:32-5.
 216. Kakiuchi C, Ishiwata M, Kametani M, Nelson C, Iwamoto K, Kato T. Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletions in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2005;8(04):515-22.
 217. Sabunciyan S, Kirches E, Krause G, Bogerts B, Mawrin C, Llenos I, et al. Quantification of total mitochondrial DNA and mitochondrial common deletion in the frontal cortex of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Journal of neural transmission*. 2007;114(5):665-74.
 218. Torrell H, Montaña E, Abasolo N, Roig B, Gaviria AM, Vilella E, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) in brain samples from patients with major psychiatric disorders: gene expression profiles, mtDNA content and presence of the mtDNA common deletion. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2013;162(2):213-23.
 219. Stork C, Renshaw PF. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Molecular psychiatry*. 2005;10(10):900-19.
 220. Kato T, Kato N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar disorders*. 2000;2(3):180-90.

221. Clay HB, Sullivan S, Konradi C. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2011;29(3):311-24.
222. Liu C-S, Tsai C-S, Kuo C-L, Chen H-W, Lii C-K, Ma Y-S, et al. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free radical research*. 2003;37(12):1307-17.
223. Malik AN, Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*. 2013;13(5):481-92.
224. Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, et al. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(6):2052-7.
225. Akgul O, Kilic E, Kilic G, Ozgocmen S. Efficacy and safety of biologic treatments in familial Mediterranean fever. *The American journal of the medical sciences*. 2013;346(2):137-41.
226. Kuemmerle-Deschner JB, Wittkowski H, Tyrrell PN, Koetter I, Lohse P, Ummenhofer K, et al. Treatment of Muckle-Wells syndrome: analysis of two IL-1-blocking regimens. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(3):1.
227. Tetlow LC, Smith SJ, Mawer EB, Woolley DE. Vitamin D receptors in the rheumatoid lesion: expression by chondrocytes, macrophages, and synoviocytes. *Annals of the rheumatic diseases*. 1999;58(2):118-21.
228. Bouillon R, De Groot L, Jameson J. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. 2001.
229. Holick MF. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(3):266-81.
230. Kisacik B, Kaya SU, Pehlivan Y, Tasliyurt T, Sayarlioglu M, Onat AM. Decreased vitamin D levels in patients with familial mediterranean fever. *Rheumatology international*. 2013;33(5):1355-7.
231. Ozer I, Mete T, Turkeli Sezer O, Kolbasi Ozgen G, Kucuk GO, Kaya C, et al. Association between colchicine resistance and vitamin D in familial Mediterranean fever. *Renal failure*. 2015;37(7):1122-5.
232. Sozeri B, Yilmaz E, Mir S, Berdeli A. Effect of colchicine-resistant familial mediterranean fever on growth parameters/kolsisine direncli ailesel akdeniz

- atesinin buyume parametlerine etkisi. Turkish Journal of Rheumatology. 2011;26(1):1-7.
233. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(12):878-90.
 234. Larman TC, DePalma SR, Hadjipanayis AG, Protopopov A, Zhang J, Gabriel SB, et al. Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(35):14087-91.
 235. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*. 2009;324(5930):1029-33.
 236. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*. 2008;320(5876):661-4.
 237. King A, Selak M, and, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*. 2006;25(34):4675-82.
 238. Reznik E, Miller ML, Şenbabaoğlu Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *eLife*. 2016;5:e10769.
 239. Mambo E, Chatterjee A, Xing M, Tallini G, Haugen BR, Yeung SCJ, et al. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *International journal of cancer*. 2005;116(6):920-4.
 240. Wang Y, Liu VW, Xue W-C, Tsang PC, Cheung AN, Ngan HY. The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: a quantitative study using laser-captured microdissected tissues. *Gynecologic oncology*. 2005;98(1):104-10.
 241. Mei H, Sun S, Bai Y, Chen Y, Chai R, Li H. Reduced mtDNA copy number increases the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic drugs. *Cell death & disease*. 2015;6(4):e1710.
 242. Thompson K, Majd H, Dallabona C, Reinson K, King MS, Alston CL, et al. Recurrent De Novo Dominant Mutations in SLC25A4 Cause Severe Early-

Onset Mitochondrial Disease and Loss of Mitochondrial DNA Copy Number.
The American Journal of Human Genetics. 2016;99(4):860-76.

