

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Fehmi AKÇİÇEK**

**AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ HASTALARINDA TOLL LİKE RESEPTÖR
2 VE 4 EKSPRESYON DÜZEYİNİN AKUT ATAĞLA İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Melia ZENGİN KARAKÖSE**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ulus Salih AKARCA**

**İZMİR
2011**

ÖNSÖZ

İç Hastalıkları asistanlığım süresince başta eğitimim olmak üzere her konuda gösterdikleri destekten dolayı öncelikle İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Fehmi Akçiçek olmak üzere bütün hocalarıma; tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ulus Salih Akarca 'ya ve tezimle özveriyle ilgilenen Doç. Dr. Kenan Aksu'ya, Gastroenteroloji Laboratuvarından Esin Salman'a, Onur Ulaş'a ve asistanlığım süresince bütün güzellikleri ve zorlukları birlikte paylaştığım uzmanlarım ve asistan arkadaşlarım ve tüm İç Hastalıklarının Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman bana destek olan anneme, babama, kardeşime ve sevgili eşime sonsuz teşekkürler...

Dr. Melia Zengin Karaköse

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
II.	AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ.....	2
	A.TARİHÇE ve EPİDEMİYOLOJİ.....	2
	B. AAA GENETİĞİ.....	3
	C. PATOGENEZ	5
	D. KLİNİK BULGULAR.....	7
	E. AMİLOİDOZ.....	11
	F. LABORATUAR BULGULARI.....	12
	G. TANI.....	12
	H. TEDAVİ	17
III.	TOLL LİKE RESEPTÖRLER.....	18
	TLR-2.....	21
	TLR-4.....	22
	TLR ve AAA ilişkisi.....	25
IV.	MATERYAL -METOD.....	28
	HASTALAR.....	28
	MOLEKÜLER TEKNİKLER.....	29
	İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	32
V.	BULGULAR.....	33
VI.	TARTIŞMA.....	41
VII.	ÖZET.....	45
VIII.	KAYNAKLAR.....	49

KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Amiloid A
AAA	Ailesel Akdeniz Ateşi
ASC	Apoptozis ilişkili Speck Protein
ASO	Antistreptolisin O
CARD	Caspase Recruitment Domain
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
ESR	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
FCU	Ailesel Soğuk Ürtikeri
Hb	Hemoglobin
HCMV	İnsan Sitomegalovirus
Hct	Hemotokrit
HCV	Hepatit C Virüs
HIDS	Hiperimmünglobülin D Sendromu
HP	Helicobacter Pylori
HSP	Isı Şok Proteinleri
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IL-1R	İnterlökin 1 reseptör
IRAK-1	IL-1R ilişkili kinaz
IRF	IFN Regülatör Faktör
LAM	Lipoarabinomannan
LBP	Lipopolisakkarid bağlayan protein
LPS	Lipopolisakkarid
LRR	Lösinden zengin tekrarlar
LTA	Lipoteikoik asit
MDA5	Melanoma Differentiation Associated Gene 5
MEFV	MEditerranean FeVer
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MWS	Muckle-Wells Sendromu
MV	Kızamık Virüs

MyD88	Miyeloid Diferansiyasyon faktör 88
NK	Natural Killer Cell
NOD	Nükleotid Bağlayan Oligomerizasyon Domain
PAMP	Hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar
PBL	Periferik Kan Lökositleri
PFAPA	Periyodik Ateş Adenopati Faranjit Aftöz sendromu
PGN	Peptidoglikan
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PYD	Pyrin Domaini
RICK	Receptör-Interacting Serine/Threonine Kinase
RIG-I	Retinoic-Acid Inducible Gene I
RSV	Respiratuar Sinsityal Virüs
SAA	Serum Amiloid A
sIL-2R	Solubl IL-2 Reseptör
SP-A	Surfaktan Protein A
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TBK1	TANK-Binding Kinase
TIRAP	TIR domaini içeren adaptör protein
TLR	Toll Like Reseptörler
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TRAM	Toll reseptör ilişkili molekül
TRAPS	TNF Reseptör ilişkili Periyodik Ateş sendromu
TRIF	TIR domain içeren adaptör protein uyaran IFN- β

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) doğal immün sistemin bir hastalığı olup, kendi kendini sınırlayan tekrarlayan ateş ve serozit atakları ile karakterize olan hereditör otoinflamatuvar bir hastalıktır. Doğu Akdeniz kökenli topluluklarda özellikle Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar'da sık görülmektedir (1). AAA tekrarlayan ve kendi kendini sınırlayan poliserozit ve ateş atakları ile karakterize olup bazı hastalarda vaskülit, deri lezyonları, amiloidoz da görülebilmektedir (2). AAA'dan sorumlu gen 16p13.3 kromozomunda yer alıp MEFV geni (MEditerranean FeVer) olarak adlandırılmıştır, bu gen pyrin (marenostrin) adlı proteini kodlar (3,4). Pyrin, lökosit spesifik inflamasyonu kontrol eden; aktivitesi pro ve anti-inflamatuvar sitokinler tarafından kontrol edilen bir proteindir (5). Atağı tetiklediği bilinen faktörler arasında fiziksel ve emosyonel stres, soğuğa maruz kalma, yağdan zengin diyet, ilaçlar (6), menstruel siklus (7), infeksiyonlar yer alır. Farklı araştırmacılar tarafından birtakım bakteriyel antijenlerin AAA hastalarında atağı tetiklediği gösterilmiş.

Doğal immün sistemden sorumlu hücreleri situmule eden birtakım mikrobiyal ürünler bilinmekle beraber, bu uyarıyı sağlayan reseptör aracılı stimulasyonlar Toll Like Reseptörler (TLR) keşfedilene kadar bilinmiyordu. TLR; TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-12 gibi inflamatuvar yanıt ile ilişkili olan sitokinlerin genetik ekspresyonunu artırır (8). TLR-4 Gram (-) bakterilerin lipopolissakkaridlerini tanırken TLR-2'nin doğal immün sistemde anahtar rol oynadığı düşünülür. TLR-2 Gram (+) bakterilerdeki lipoteikoik asid gibi mikrobiyal ürünleri ve endojen inflamatuvar mediatörleri tanır (8,9).

AAA'nın patogeneziindeki araştırmalarda ilerleme kaydedilmesine rağmen atakların kendi kendini sınırlayan doğası ve periyoditesi hala aydınlatılamamıştır. Atakların periyoditesi belki genetik kod ve mutant MEFV gen ürünü ile açıklanabilse de bu hipotez atak sıklığındaki kişisel farklılıkları açıklayamaz (10). Bu çalışmadaki amacımız AAA tanılı hastalarda atak sırasında ve ataksız dönemde TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerini değerlendirerek atakların doğasına ışık tutmaktır.

II. AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ

A. TARİHÇE ve EPİDEMİYOLOJİ

Hastalığın ilk kez 1908 yılında Janeway ve Rosenthal tarafından tekrarlayan ateş, karın ağrısı ve lökositozu olan 16 yaşındaki bir çocuğun bildirilmesi ile tanımlandığı kabul edilmektedir (11). 1945 yılında ise hastalık; Siegal tarafından kendisinde ve New York'ta yaşayan 10 Ashkenazi Yahudisinde aynı klinik tablonun saptanması ile Benign Paroksizmal Peritonitis adı ile yeniden tanımlanmıştır (12). Mamau ve Kattan tarafından 1952'de genetik geçişi ve amiloidoz ile ilişkisi gösterilmiştir (13). Türkler tarafından ilk kez 1946'da rapor edilmiş (14), Yarkın ve arkadaşları tarafından 1955'de 5 hastalık bir seri bildirilmiştir.

İlk kez 1972 yılında Goldfinger tarafından AAA tedavisinde kolşisinin faydaları ortaya konulmuştur (15). 1992 yılında hastalıktan sorumlu genin 16. kromozumun kısa kolunda bulunduğu saptanmıştır. AAA gen lokalizasyonunun tam olarak belirlenmesi ve klonlanmasından sonra 1997 yılından itibaren hastalıkla ilgili mutasyonlar tanımlanmaya başlamıştır (3,4).

AAA özellikle Akdeniz popülasyonundaki bazı etnik gruplarda (Dürziler, Askenazi Yahudilerinde, Sephardik Yahudilerinde, Araplar, Ermeniler, Türkler ve diğer Akdeniz ülkelerinde) daha sık görülmektedir (1). Yunanistan, İtalya, İspanya, Lübnan, Japonya ve Avusturya'da da hastalık saptanmıştır (16,17,18,19,20). Portekiz, Çin, Afganistan, Mısır ve Macaristan kökenli olgu bildirimleri de mevcuttur. Taşıyıcılık oranının; Kuzey Afrika Yahudilerinde 1/6, Askenazi Yahudilerinde 1/135 olduğu tahmin edilmektedir (21). Ülkemizde hastalık en sık orta Anadolu bölgesinde görülmektedir (22). Hastalığın Türkiye'de prevalansın 1/1000 ve taşıyıcılığın %20 olduğu tahmin edilmektedir (22). Erkek kadın oranı 1,5-2/1 olarak bildirilmektedir (23).

B.GENETİK

1992 yılında hastalıktan sorumlu gen 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) belirlenmiş olup 1997 yılında iki ayrı araştırma grubu tarafından (Fransız AAA Konsorsiyumu ve Uluslararası AAA Konsorsiyumu) klonlanarak MEFV (MEditerranean FeVer) geni olarak adlandırılmıştır (3,4). MEFV (MEditerranean FeVer) geni 10 ekson ve 9 intron içeren cDNA'sı 15 kb, 3505 nükleotid uzunluğunda, 781 aminoasitlik bir proteini kodladığı ve olgun granülositlerde ekspresyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir (24,25). MEFV geninin kodladığı bu proteine Uluslararası AAA Grubu Yunanca ateş anlamına gelen "pyrin", Fransız AAA Grubu ise Latince Akdeniz anlamına gelen "Marenostrin" adını vermişlerdir.

Bugüne kadar toplamda 197 mutasyon ve polimorfizm tespit edilmiştir (26). Hastalıkla ilişkili mutasyonlar genellikle genin 10, 5, 3 ve 2. eksonlarında saptanmıştır. Fransız AAA Konsorsiyumu kendi çalışma gruplarında taşıyıcı kromozomların %85'inde hastalıkla ilgili olan 4 mutasyon göstermişlerdir (M694V, M680I, M694I, V726A) (4). Bu dört mutasyon 10. eksonda yer almaktadır (27). Mutasyonlar toplumlar arasında değişkenlik göstermektedir (Tablo 1). Farklı 14 toplumun tüm AAA hastalarında saptanan MEFV mutasyon sıklığı % 71,2 ayrı ayrı bakıldığında, M694V (39,6%), V726A (13,9%), M680I (11,4%), E148Q (3,4%), M694I (2,9%) olarak bildirilmiştir (28). Türk hastalarda M694V sıklığı (%51,4), M680I (%14,4), V726A (%8,6) saptanmıştır (22). Amiloidozlu hastalarda en sık M694V homozigotluğunun olması bu mutasyonun amiloidoza yatkınlık oluşturduğu sonucunu ortaya koymuştur (29,30,31). Bunun aksine V726A mutasyonunun tanımlandığı Askhenazi Yahudileri, Dürziler, Ermeniler ve Irak Yahudileri gibi bazı etnik gruplarda düşük bulunan amiloidoz düzeyi, bu mutasyonun amiloidoza karşı koruyucu etkisini düşündürmektedir (32).

Tablo 1. Farklı toplumlara ait MEFV mutasyon dağılımı (28)

	n	M694V	V726A	M680I	M694I	E148Q	Diğer/Bilinmeyen
Araplar	706 (%100)	141 (%20)	99 (%15)	99 (%15)	85 (%12)	42 (%6)	290 (%42)
Ermeniler	6000 (%100)	2586 (%43)	1140 (%19)	955 (%16)	20 (%0,3)	112 (%1,9)	1187 (%19,8)
Giritliler	142 (%100)	39 (%27,5)	7 (%5)	0 (%0)	10 (%7)	20 (%14)	66 (%46,5)
Kıbrıslılar	68 (%100)	12 (%18)	17 (%25)	0 (%0)	2 (%3)	5 (%7)	32 (%47)
Fransızlar	86 (%100)	4 (%6)	0 (%0)	0 (%0)	4 (%6)	6 (%7)	72 (%81)
Yunanlılar	304 (%100)	80 (%26)	21 (%7)	39 (%13)	8 (%3)	19 (%6)	137 (%45)
İtalyanlar	62 (%100)	10 (%16)	3 (%5)	6 (%10)	5 (%8)	11 (%17)	27 (%44)
Yahudiler	1302 (%100)	847 (%65)	39 (%3)	13 (%1)	201 (%15)	65 (%5)	137 (%11)
Ürdünlüler	110 (%100)	27 (%25)	15 (%14)	10 (%9)	2 (%2)	5 (%5)	51 (%45)
Lüblanlılar	1116 (%100)	194 (%17)	124 (%12)	47 (%4)	82 (%7)	53 (%5)	616 (%55)
İspanyollar	100 (%100)	12 (%12)	1 (%1)	0 (%0)	4 (%0)	5 (%5)	78 (%78)
Suriyeliler	166 (%100)	76 (%45)	23 (%14)	16 (%10)	8 (%5)	10 (%6)	33 (%20)
Tunuslular	278 (%100)	29 (%10)	5 (%2)	34 (%12)	14 (%5)	19 (%7)	177 (%64)
Türkler	1390 (%100)	626 (%46)	153 (%11)	181 (%13)	97 (%7)	28 (%2)	305 (%23)
Toplam	11830 (%100)	4683 (%40)	1647 (%14)	1350 (%11)	341 (%3)	400 (%4)	3409 (%28)

Silinmiş: ¶

C.PATOGENEZ

AAA hastalığının etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Mutant MEFV gen ürünü olan pyrinin veya Marenostinin bozulmuş fonksiyonu, azalmış MEFV mRNA ekspresyonu, C5a inhibitör proteininin yetersizliği, katekolaminlerin depolanma ve salıverilme biyoritminde dengesizlik, lipokortin yetersizliği, inflamasyonun rolü, menstrüasyon, fiziksel ve emosyonel stres ve infeksiyonların rolü üzerinde durulmaktadır.

AAA hastalığına neden olan MEFV geni sağlıklı bireylerde pyrin ya da marenostin adını verdikleri ve normal koşullarda inflamasyonu kontrol altında tutmaya yarayan bir proteini kodlamaktadır. Bu yüzden bu gende oluşacak mutasyonlar pyrinin görevini yapamamasına ve inflamasyon kontrolünün bozulmasına neden olur (33,34). MEFV geni, esas olarak granülosit ve monositlerde, daha az oranda eozinofil, dendritik hücreler ile cilt, sinovya, peritondaki fibroblastlarda, dalak, akciğer ve kasta eksprese edilir (35,36,37).

C5a nötrofiller için kemotaktik etkilidir ve güçlü bir inflamasyona neden olmaktadır. Serozal yüzeylerdeki fibroblastlar tarafından üretilen C5a inhibitör protein ise oluşan bu inflamasyonu belli bir noktadan sonra baskılamakta ve IL-8'i inhibe etmektedir (38). Sağlıklı bireylerde mutant olmayan MEFV geninden sentezlenen pyrin molekülü C5a inhibitör düzeylerini yüksek tutarak bazı inflamatuvar yanıtları baskılamaktadır. Mutant MEFV gen ürünü olan pyrin ise herhangi bir sebeple inflamasyon tetiklendiğinde C5a inhibitör aktivitesinin ve seviyesinin yüksek kalmasını sağlayamayarak atak gelişmesine neden olmaktadır (39). Matzner ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada AAA hastalarının eklem ve peritoneal sıvılarında C5a inhibitör protein seviyelerinin düşük olduğu saptanmıştır (40,41). Ayrıca AAA hastalarında MEFV mRNA ekspresyonu sağlıklı kişilere göre düşük düzeyde bulunmuştur (42).

AAA hastalarında atak sırasında serözal ve sinoviyal yüzeylerde polimorf nüveli lökositlerin baskın olduğu ve TNF-alfa, CRP, IL-6, soluble TNF reseptör süper ailesi IA ve IB, sIL-2r düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (43). Ataksız dönemde de

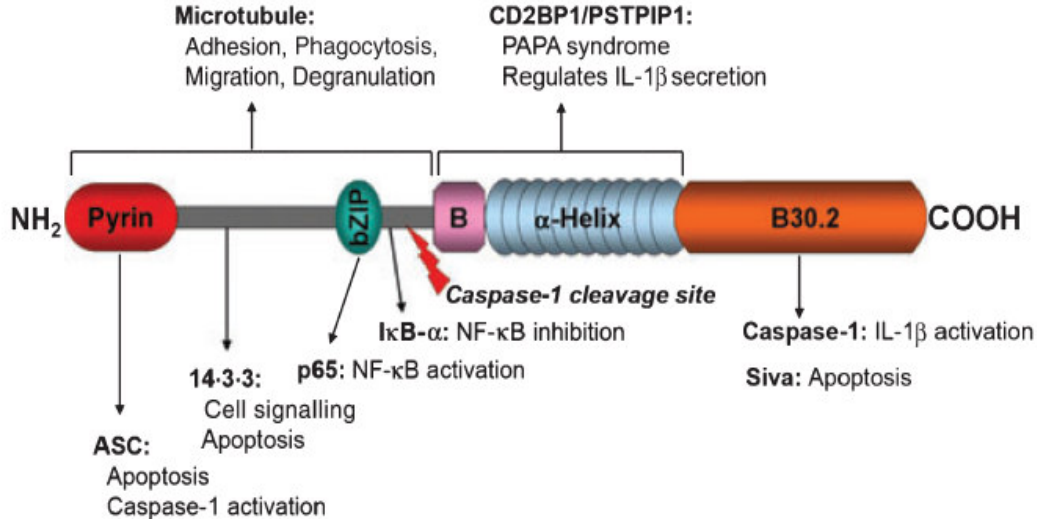
bazı sitokinlerin (IFN-gama, TNF-alfa, IL-1, IL-6 ve IL-8) mRNA üretiminin arttığı saptanmıştır (41,44,45).

Shohat ve ark. tarafından yapılan çalışmada; fosfalipaz A2 enzim inhibitörü olan lipokortinin genetik defekte bağlı olarak eksik olabileceği ve AAA hastalarında kortikosteroidle tedavinin başarısız olmasının buna bağlı olduğu ileri sürülmüştür (46).

Bir diğer hipotez de AAA ataklarının stres ile ortaya çıkmasına dayanmaktadır. 1976 yılında Hayashi ve ark. tekrarlayan peritonit atakları olan bir hastanın ataklarının reserpin ile baskılandığını ve noradrenalin infüzyonu ile uyarıldığını göstermiş ve hastalığın patogenezinde katekolamin metabolizmasına dikkat çekmiştir (47). Baraket ve arkadaşları katekolamin metabolizmasında muhtemel bir bozukluğu ortaya koymak amacıyla sempatomimetik etkili bir ajan olan metaraminol infüzyonunu kullanmışlardır. Burada metaraminole bağlı endojen katekolamin deşarjı ile AAA benzeri semptomlar oluşturulmaya çalışılmıştır. İnfüzyon sonrası ortaya çıkan şikayetler AAA ataklarına benzemekte ve kolşisin tedavisinden fayda görmektedir (48). Ancak bu durum diğer araştırmalarla desteklenememiştir

Patogeneizde son yıllarda pyrin domainleri üzerinde durulmaktadır. 781 aminoasitlik proteinden oluşan pyrin dört farklı domain içermektedir. Bunlar PYD (pyrin domaini), B30.2 (C terminalinde lokalizedir), B-box ve coiled-coil (CC) domainleridir. PYD N-terminaline lokalize olup 92 aminoasitten oluşmaktadır. PYD apoptoziste görev alan DD (death domain), DED (death effector domain) ve CARD (caspase recruitment domain) bölümleri ile benzerlik gösterir. Ailevi Akdeniz Ateşi ile ilgili mutasyonların çoğu karboksi ucunda bulunan ve 10. ekzon tarafından kodlanan B30.2 bölümünü etkilemektedir. PYD 'apoptozis ilişkili speck protein' (ASC) ile etkileşim halindedir (49). PYD, "ASC proteinin pyD bölümü"ne bağlanır. Bu etkileşim ile apoptozis tetiklenir ve NF-κB aktive olur. NF-κB'nin aktive olması apoptozis proteinlerinden, kaspas 1 ve 5'i aktive eder. Kaspas 1'in aktive olması inflamasyonun en önemli sitokinlerinden olan interlökin 1'in (IL-1) ve apoptozis yolunun aktif hale gelmesini sağlar. NF-κB'nin bu işlemler sırasında ki rolü hem inflamasyonun gelişimine yol açmak hem de düzelmesine katkıda bulunmaktır (Şekil 1). Ailevi Akdeniz Ateşi'nde bulunan mutasyonlar sonucunda pyrinin ortaya çıkışının azaldığı

çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Sonuç olarak pirin proteinin ASC ile ilişkisi bozulmakta apoptozis olamamakta ve inflamasyon baskılanamamaktadır (50,51,52).



Şekil 1. Pyrin bölgeleri ve fonksiyonları

Bir diğer önemli hipotez ise infeksiyonlar ile AAA atakları arasındaki ilişkidir. 2005 yılında Ozel ve ark.'nın AAA tanılı hastalarda yaptıkları çalışmada *Helicobacter pylori* (HP) pozitif hastaların HP negatif hastalara göre daha sık ve daha şiddetli atak geçirdiklerini saptamışlar (53). F. Yalçinkaya ve ark. tarafından yapılan çalışmada AAA hastalarında antistreptolisin O (ASO) ve anti-DNAse B seviyelerine bakılmış ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu izlenmiş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüş (54,55). Farklı araştırmacılar tarafından birtakım bakteriyel antijenlerin AAA hastalarında atağı tetiklediği gösterilmiştir (56,57,58).

D.KLİNİK BULGULAR

Hastalık ateşli, ağrılı ataklarla karakterize olup 38,5-40 C° arasındaki yüksek ateşe, periton, plevra ya da sinovyum seröz membranlarından birinde oluşan inflamasyonun neden olduğu ciddi karın, göğüs veya alt ekstremitte büyük eklemlerinden birinin ağrısı eşlik eder. Hastalar genellikle atakları başlatan bir etken tarif etmezler. Bazı hastalarda AAA ataklarının menstruasyon, duygusal stres veya ağır fiziksel aktivite dönemlerine rastladığı görülür. Bazı hastalarda ise titreme

benzeri şikayetlerin bulunduğu bir prodrom dönemi görülmektedir. Ataklar arasında hastalar tamamen normaldir ve atakların tekrarlama süreleri öngörülememektedir. Bazen atakların aylarca hatta yıllarca tekrarlamadığı görülmektedir.

Ataklar kısa süreli olup 1-3 gün sürer ve tedavi edilmeden spontan iyileşir. Ancak atağa eşlik edebilen artrit veya artralji daha uzun sürebilmektedir. Ortaya çıkan ateşin yüksekliği ya da tutulan inflamasyon bölgesi bir ataktan diğerine farklılık gösterebilir. Ömür boyu süren bu hastalığın seyrinde klinik heterojenite mevcuttur ve bir hastada aynı tip atak görülürken, farklı hastalarda farklı atak tipleri tanımlanmıştır (59). AAA semptomları hastaların %70'inde hayatın ilk on yılında, %90'ında yaşamın ilk yirmi yılında ortaya çıkmaktadır (60, 61).

Ateş

Çocukluğun erken döneminde tekrarlayan ateş AAA'nın tek belirtisi olabilir. 38,5-40 C° arası yüksek ateş AAA'nın önemli bir bulgusu olup 1-3 gün sürer. 40° C'ye varan, ağrı ya da başka lokalize inflamasyon bulgularının eşlik etmediği kısa süreli izole ateş yükselmeleri özellikle çocuk hastalarda görülüp birkaç saat sürer. AAA'nın bu fenomeni çoğu zaman yanlışlıkla viral farenjite veya tonsillite bağlanır (59). Bazı ataklarda ateş tek bulgu olarak karşımıza çıkabilmektedir.

Karın Ağrısı

AAA'nın en sık bulgusu hastaların %90'ında görülen karın ağrısıdır. Bu karın ağrısı atakları ani başlangıçlı ateş ve karının değişik bölgelerinde başlayıp sonra tüm karına yayılan ağrı olarak ortaya çıkarlar. Hastanın fizik muayenesinde barsak seslerinin kaybı, hassasiyet, karın kaslarında tahta karın rijiditesi ve karında distansiyon sık rastlanan bulgulardır. Barsak seslerinin yokluğu ve radyografide ince barsakta multiple küçük sıvı seviyelerinin görülmesi akut batın oluşturan hastalıkları akla getirir. Eğer hasta opere edilmediyse bu bulgular 6-20 saat sonra geriler, ataklar genellikle 24-48 saatte geçer ve hasta atak öncesindeki kadar iyi olur.

Akut inflamasyon sırasında peritonda oluşan nötrofilden zengin eksudanın organize olması fibröz adezyonlara bu da nadiren mekanik ileus oluşumuna neden

olabilir. Hastaların geçmişinde genellikle steril inflame peritonit dışında negatif olarak sonuçlanmış apendektomi, eksploratif laparotomi ve laparoskopi bulunur. Karın ağrısı ile başvuran hastaların ayırıcı tanısında çok sayıda hastalık olmasına rağmen AAA hastalarının şikayetlerinin 20 yaşından önce başlaması nedeniyle akut apandisit düşünülmektedir. Ancak ateş ve ağrının kendiliğinden gerilemesi veya apendektomi sonrasında tekrarlaması diğer tanılara yöneltmektedir. Daha önce çok sayıda atak olmasına rağmen tanı koymak güç olabilir çünkü pek çok hastalık tekrarlayan karın ağrısı ve ateş ile seyredebilir (porfiri gibi). Peritonit peristaltizmi azalttığından hastalar diareden çok konstipasyondan şikayet ederler (59, 62,63,64,65).

Göğüs Ağrısı

Plörit unilateral veya bilateral göğüs ağrısına neden olup hastaların %25-50'sinde görülür. Semptomlar 24-72 saat sürer ve sıklıkla tek taraflı olan febril plörit, ani başlangıçlı ve önceden belirlenemeyen tekrarlarla seyreder (66). Sıklıkla daha uzun süren infeksiyöz plöritten hızlı bir şekilde düzelmesi ile ayırtedilebilir. Nefes alıp verirken ağrı olur ve etkilenen tarafta solunum sesleri azalır. Kosta frenik sinüsteki az miktardaki eksuda radyolojik olarak gösterilebilir. Bu eksuda çok sayıda nötrofil içerip 48 saat içinde geriler (59). Bu atakların sıklığı çeşitli etnik kökenler arasında farklılık gösterip Türkler ve Ermenilerde non-Ashkenazi Yahudilere göre daha sıktır (67). Ayrıca M694V homozigotluğu ile plörit arasında ilişki saptanmıştır (30).

Perikardit ataklarında retrosternal ağrı, EKG'de ST elevasyonu, ekokardiyografide perikardial efüzyona dair kanıtlar veya göğüs radyogramında kalp gölgesinde geçici genişleme görülebilir (68). Ekokardiyografi bulguları olguların %25'inde belirlenebilir (69).

Eklem Ağrısı

Eklem bulguları hastaların 1/3'ünü etkiler (70). Artrit sıklıkla monoartikular veya oligoartikulardır. Diz, ayak bileği, kalça, omuz, dirsek eklemi diğer eklemlere göre daha sık tutulur (59, 71). Artiritin şiddeti etnik farklılıklar gösterebilmektedir.

Kuzey Afrika kökenli Yahudiler’de en sık olup, Irak kökenli Yahudiler’de, Ermeni ve Türkler’de daha düşük sıklıkta görülür (72). Eklemde efüzyon sinovit atağı süresince sıktır. Eklem sıvısı incelendiğinde 200-1.000.000 lökosit /mm³ (çoğunluğu polimorf nüveli lökosit) ve artmış protein saptanır ve sterildir. Akut atak sırasında direk grafilerde kemik yapılarda herhangi bir değişiklik bulunmaz (73). Atak genelde birkaç gün içerisinde geriler ancak semptomlar bir aya kadar uzayabilir (74).

Hastaların %5’inde bir aydan uzun süren artrit yakınması olabilir. Sinovit genellikle eklem hasarı olmadan geriler. Bununla birlikte kalıcı deformiteye, fonksiyonel sınırlandırmaya, osteoporoza ve aseptik nekroza neden olduğu bildirilmiştir (75). Artralji artritiden daha sıktır ve diz, ayak bileği gibi büyük eklemleri etkiler, fiziksel egzersiz ile ilişkisi olabilmektedir (76).

AAA’lı hastalarda eklem tutulumunun daha nadir bir şekli de HLA-B27’nin negatif olduğu spondiloartropatidir. Bu hastalarda sıklıkla unilateral veya bilateral sakroileit, tekrarlayan entezit ve radyografik spinal tutulumun görüldüğü sırt ve boyun ağrısı görülür. Spondiloartropati kolşisin tedavisine yanıtızsız iken, non-steroid antiinflatuar ilaçlar ve ikinci basamak antiromatizmal ilaçlar ile tedavi etkilidir (77).

Kas Ağrısı

Miyalji, AAA’nın sık görülen bulgularındandır ve hastaların yaklaşık %20’sinde ortaya çıkar. Ağrı sıklıkla ciddi olmayıp fizik egzersiz ve uzun süre ayakta kalma sonrası ortaya çıkar, birkaç saatten bir güne kadar sürebilir. İstirahat veya nonsteroid antiinflatuar ilaçlarla düzelir (78).

Nadir olarak bildirilen febril miyalji kliniği ateş yüksekliği, kas ağrıları, karın ağrısı (periton irritasyonu olmadan), akut faz belirteçlerinde yükseklik ile açıklanmaktadır (79). Bu olgularda steroid ihtiyacı olabilmektedir.

Cilt Bulguları

Cilt ile ilgili bulguların sıklığı çeşitli yayınlarda %12 ile %43 arasında saptanmıştır (75,76, 80,81). Bunlar içinde en sık görüleni olan erizipel benzeri eritem AAA’lı çocukların %11’inde görülür. Bu lezyonlar düzgün sınırlı, kırmızı, yama

şeklinde döküntü ile karakterizedir. Sıcak, ağrılı ve şiş olup 10 ile 35 cm²'lik bir alanı kaplar. Çoğunlukla alt ekstremitelerde ayak bileği ile diz arasında bulunurlar. Beraberinde 1-2 gün süren ateş yüksekliği bulunabilir (30). Bunun dışında ödem, tekrarlayan oral aftlar, purpura, psöriazis, eritema nodozum da AAA'da görülebilen mukokütanöz lezyonlardır (30).

Nadir görülen diğer durumlar kendini sınırlayan orşit, rekürren aseptik menenjit, splenomegali (82) ve Poliarteritis Nodosa, Henoch-Schonlein purpurası gibi vaskülitlerdir (83,84,85,86).

E.AMILOİDOZ

Amiloidoz, çeşitli organlarda fibriler proteinlerin depolanması ile karakterize bir protein metabolizması hastalığıdır. Sistemik amiloidozun etyolojisi multifaktöriyel olup primer ve sekonder (reaktif) tipleri tanımlanmıştır (87). AAA amiloidoz ilişkisi ilk kez 1955'te tanımlanmıştır.

Amiloidoz, AAA'lı hastalarda sık görülen bir durum olup, AAA'nın amiloid A (AA) protein depolanmasından kaynaklanan en ciddi komplikasyonudur. AA protein, karaciğerde yapılan bir akut faz reaktanı olan serum amiloid A'nın (SAA) bir yıkım ürünüdür. SAA'nın uzun süre plazmada yüksek konsantrasyonda bulunması AA proteinin dokularda birikimine neden olur ancak SAA'nın artmış konsantrasyonu amiloidoz gelişimini açıklamak için yeterli değildir. Çevresel etkenlerin de rolü olabilir. Amiloidoz insidansı, Ermenistan Ermenileri'nde % 24 iken, aynı mutasyonu taşıyıcıları dahi Amerika Ermenileri'nde % 1-2 civarında bulunmuştur (88). Son zamanlarda yapılan çalışmalar amiloidogenezin genetik alt yapısını açıklama konusunda SAA polimorfizmi üzerine odaklanmıştır (89 ,90).

AAA'da görülen amiloidozun atakların sıklığı, süresi ve şiddetinden bağımsız olduğu düşünülmektedir (91). Bu görüş büyük oranda amiloid nefropatisi, ateş ve inflamasyon atağı görülmeden önce ortaya çıkan fenotip 2 hastalarına dayanmaktadır. Amiloidoz aile öyküsü olması amiloidoz gelişme riskini artırmaktadır (92).

Amiloidoz gelişirken erken dönemde idrarda proteinüri görülmektedir. Bu hastalar çoğunlukla normotansif ve nonhematüriktir (59). Bunun dışında kalp, böbrek üstü bezleri, karaciğer, tiroid ve ince bağırsaklarda da amiloidoza rastlanabilir (93). Proteinürinin başlangıcından ortalama 2 -13 yıl sonra son dönem böbrek yetmezliği gelişebilmektedir (59). Proteinüri saptanan hastalarda renal veya rektal biyopsi ile mutlaka amiloidoz gösterilmelidir. Kolşisin tedavisinden önce Askenazi Yahudilerinde amiloidoz %30 sıklığında görülmekteyken Türklerde bu oran % 60 dolaylarında görülmekteydi (94). Kolşisin tedavisinin atakları tamamen önleyemese bile AAA'lı hastaların çoğunda amiloidoz gelişimini engellediği kesin olarak kanıtlanmıştır (95).

F. LABORATUAR BULGULARI

Ataklar sırasında sık rastlanılan bulgular eritrosit sedimentasyon oranının (ESR) yüksek olması, lökosit artışı (lökositoz) ve akut faz yanıtındaki artıştır (CRP, Serum amiloid A, fibrinojen, haptoglobulin, C3,C4). Bu bulguların akut ataklar arasındaki dönemde normal olduğu bildirilmesine karşın son zamanlarda serum amiloid A'nın (SAA) subklinik inflamasyonu saptamada en iyi gösterge olduğu sonucuna varılmıştır (96, 89).

Ataklar sırasında geçici albuminüri ve mikroskopik hematüri görülebilmektedir (97). IL-1, IL-6 ve TNF- α atak sırasında hastalarda yüksek bulunurken, IL-6'nın ataklar arasındaki dönemde de kontrol grubundan yüksek olduğu ve bunun devam eden subklinik inflamasyonun göstergesi olabileceği düşünülmüştür (98). Atak sırasında çözünür IL-2 reseptör (sIL-2R) düzeylerinin arttığı ve AAA'da sIL-2R'in aktivite kriteri olabileceği ileri sürülmüştür (99). Serozal sıvılarda C5a inhibitör aktivitesinde azalma saptanmıştır (100). AAA'ya bağlı gelişen sinovitte sinovyal sıvı oldukça bulanık olup inflamatuvar sıvı özelliğinde görülür ancak viskozitesi korunmuştur ve sterildir (101).

G.TANI

Yakın zamana kadar AAA için spesifik laboratuvar testi yoktu. AAA geni 1997 yılında klonlanana kadar hastalığın moleküler düzeyde tanısı yapılamamaktaydı. AAA hastalığında görülen bulguların pek çoğunun AAA'ya özgü olmaması ve bulguların

pek çok hastalıkta da görülebilmesi bu hastalığın tanısında zorluklarla karşılaşılabilmesi gerçeğini ortaya koymaktadır. Günümüzde hastalığın tanısında klinik bulgular, aile öyküsü ve moleküler tarama birlikte kullanılmaktadır. İnflamatuvar süreci yansıtan testler (C reaktif protein, sedimantasyon, fibrinojen, Serum amiloid A, tam kandaki lökosit sayısı) tanı kriteri olmamakla beraber tanıyı desteklerler (102). Uygun klinik bulguların varlığı, uygun etnik gruptan olma, tedavide kolşisine yanıt verme ve başka bir nedene bağlı olmayan AA tipi amiloidoz tanı için önemlidir. Hastalar, 2 fenotipe ayrılırlar: **Tip I fenotipte**, hastalık kliniği mevcuttur, ataklarla seyreder. **Tip II fenotipte**, AAA atağı yoktur, AA tipi amiloidoz mevcuttur (15).

Tanı için değişik kriterler geliştirilmiş olup bunlar içinde en sık kullanılan Tell-Hashomer kriterleridir (103). Tell- Hashomer kriterlerinin yanısıra kullanılan bir başka kriter de Livneh ve arkadaşları tarafından önerilen kriterlerdir (104) .

TELL-HASHOMER KRİTERLERİ

Major Kriterler:

1. Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları
2. Predispoze hastalık olmadan AA tipi amiloidoz olması,
3. Sürekli kolşisin tedavisine iyi yanıt

Minör Kriterler:

1. Tekrarlayan ateşli ataklar
2. Erizipel benzeri eritem
3. Birinci derece akrabalarda AAA olması

Kesin tanı: 2 major veya 1 major 2 minör kriter

Muhtemel tanı: 1 major ve 1 minör kriter

LİVNEH VE ARKADAŞLARININ ÖNERDİĞİ YENİ KRİTERLER

Major Kriterler:

Tipik Ataklar (tekrarlayan ≥ 3 aynı karakterde, atak süresinin 12-72 saat olması ve ateşli olması; ateş $\geq 38^{\circ}\text{C}$)

1. Yaygın peritonit
2. Plörit (tek taraflı)veya perikardit
3. Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği)
4. Yalnızca ateş (rektal ısının $\geq 38^{\circ}\text{C}$ olması)
5. İnkomplet abdominal ataklar

Minör Kriterler:

1. İnkomplet göğüs atakları
2. İnkomplet artrit atakları
3. Egzersizle ortaya çıkan bacak ağrısı
4. Kolşisine iyi yanıt

İnkomplet Ataklar

- Vücut ısısının $< 38^{\circ}\text{C}$,
- Sürenin daha uzun veya kısa olması (6 saat-1 hafta)
- Abdominal atak boyunca peritoneal bulguların olmaması
- Lokalize abdominal ataklar
- Spesifik eklemlerin dışındaki eklem tutulumu

Destekleyici Kriterler:

- Ailesinde AAA bulunması
- Etnik köken
- Atakların 20 yaşından önce başlaması
- Atağın ciddi yatak istirahati gerektirmesi
- Atakların kendiliğinden geçmesi
- Ataklar arası semptom olmaması
- Geçici enflamasyonu gösteren anormal test cevabı (lökositoz, ESH, fibrinojen, SAA artışı)

- Tekrarlayan proteinüri ya da hematüri
- Gereksiz laparotomi veya apendektomi hikayesi
- Akraba evliliği

Kesin tanı için

1 major kriter veya;

En az iki minör kriter veya;

1 minör 5 destekleyici kriter veya;

1 minör ve destekleyici kriterlerden ilk 5 tanesinin 4'ü gerekmektedir.

Livneh ve arkadaşlarının tanı için yapmış olduğu kriterlerin spesifitesi %99, sensivitesi %95 olarak bildirilmiştir (105) .

HASTALIK AĞIRLIK SKORLAMASI

AAA hastalarında hastalığın ağırlığını belirleyebilmek amacıyla aşağıdaki kriterler ve puanlama sistemi geliştirilmiştir (106).

1. Başlangıç yaşı

5 yaş altı: 3 puan

5-10 yaş arası: 2 puan

10-20 yaş arası: 1 puan

20 yaş üstü: 0 puan

2. Atak sıklığı

Ayda ikiden fazla atak: 3 puan

Ayda 1-2 atak: 2 puan

Ayda bir ataktan az: 1 puan

3. Atakları kontrol eden kolşisin dozu

Yanıt yok: 4 puan

2 mg/gün: 3 puan

1,5 mg/gün: 2 puan

1mg/gün: 1 puan

4. Eklem tutulumu

Uzamış artrit: 3 puan

Akut eklem tutulumu: 2 puan

5. Erizipel benzeri eritem varsa: 2 puan

6. Amiloidoz

Varsa: 3 puan

Fenotip II şeklinde ortaya çıkarsa: 4 puan

Ağırlık Skorlama:

Hafif hastalık: 2-5 puan

Orta ağırlıkta hastalık: 6-10 puan

Ağır hastalık: 10 puan ve üstü.

Ayırıcı tanıda AAA haricindeki herediter periyodik ateş sendromları düşünülmelidir. Bunlar arasında Tümör Nekrozis Faktör Reseptör ilişkili Periyodik Ateş sendromu (TRAPS), Hiperimmünglobülin D sendromu (HIDS), Muckle-Wells sendromu (MWS), Ailesel Soğuk Ürtikeri (FCU), Kronik İnfanlil Nörolojik Kutanoz ve Artiküler sendrom (CINCA), Periyodik Ateş Adenopati Faranjit Aftöz sendromu (PFAPA) sayılabilir (107).

GENETİK TANI

Tipik klinik özellikleri taşıyan ve etnik kökeni uygun olan hastalarda tanı genetik doğrulama olmadan da konulabilir ancak atipik klinik bulgularla ortaya çıkıp aile öyküsü bulunmayan ya da etnik kökeni uygun olmayan hastalarda genetik tetkik tanıyı doğrulamak için gerekebilir (89).

Kesin tanı için MEFV geninde her iki alelde de mutasyonun olması gerekmektedir. Ancak günümüzde MEFV geninde çok sayıda mutasyon tanımlanmasına rağmen pek çok merkezde bunlardan yalnızca sık görülenler bakılmaktadır. Klinik olarak kuvvetle AAA düşünülen hastada bakılabilen bu mutasyonlar bir ya da iki alelde negatif bile olsa tanı kesin kabul edilir ve tedaviye başlanır. Şüpheli kliniği olanlarda her iki alelde mutasyon varlığı ile tedaviye karar verilir.

AAA'lı hastaların aile taramalarında asemptomatik bireylerde mutasyonların iki alelde de taşınabildiği gösterilmiş ve farklı araştırmacılar tarafından farklı öneriler ortaya atılmıştır. Bir grup araştırmacı AAA kliniği ortaya çıkmamış olsa bile özellikle M694V homozigotluğu gibi amiloidozla ilgili olduğu düşünülen durumlarda tedavi önermektedir (108). Daha çok kabul gören görüş klinik bulguların ve aile öyküsünün mutasyon analizinden daha önemli olduğu, genetik tanının destekleyici unsur olduğu yönündedir.

H.TEDAVİ

Günlük kolşisin tedavisi 1972 yılında ilk kez Goldfinger tarafından kullanılmaya başlanmıştır (4,109). Colchium, çayır safrasının latince adı olup, kolşisin, Karadeniz'in doğu kıyısında eski adı Colchis olan yerde yetişen bu bitkiden elde edilir. İlk kez 6. yüzyılda gut hastalığı için kullanıldığı sanılmaktadır (110).

Kolşisinin hangi mekanizma ile AAA amiloidozunda etki gösterdiği net olmamakla beraber, antiinflamatuvar, antimitotik, apoptotik ve antifibrotik etkileri olduğu bilinmektedir (111 ,112). Polimorf nüveli lökositlerden sitokin yapımını modüle ettiği ve nötrofillerde alfa selektin ve damar endotelinde e-selektin salınımını değiştirdiği sanılmaktadır (112). Lökosit kemotaksisini, ekstrasellüler boşluğa kollajen

transportunu, mitoz için gerekli olan intrasellüler fibriler yapıların yerleşimini ve motilitesini engeller (89). AAA'lı hastaların periton ve diğer serozal sıvıları incelendiğinde C5a inhibitörünün azaldığı saptanmıştır. C5a nötrofillerin o bölgeye kemotaksisini sağlar. AAA'daki kontrolsüz olarak artmış olan inflamasyondan C5a inhibitör eksikliğinin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kolşisinin ise bu inflamasyon sürecinin başlangıcında C5a salınımını önlediği ve bu şekilde etki ettiği sanılmaktadır.

Hastaların yanıtına göre 1-2 mg/gün dozda kullanılır. Renal amiloidoz gelişen hastalarda 2 mg/gün dozda kullanılması uygun görülmüştür. Amilodoza bağlı böbrek yetmezliğinde tavsiye edilen doz da 2 mg'dır. Üremik hastalar yan etki oranının artmasından dolayı bu dozu iyi tolere edememektedirler (113).

Kolşisine yanıtızsız hastalarda ataklar esnasında interferon alfa uygulaması konusunda tutarsız sonuçlar bulunmaktadır (114,115,116). Anti-IL-1 (Anakinra) ve anti-TNF (etanercept, infliximab) ajanların tedavide kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (117).

III. TOLL LIKE RESEPTÖRLER

Toll-like reseptörler, birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 transmembran proteinleridir (118). İmmün sistem, doğal (nonspesifik) ve adaptif olarak iki kısımda incelenebilen bir savunma sistemidir. Bu iki sistem birbiriyle çok hassas bir denge içerisinde olup konağı patojenlere karşı korumaktadır. Doğal immünite, bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip olan savunma sistemidir. Adaptif immün sistem ise immünolojik hafızanın gelişimi ve infeksiyonun geç fazında patojenlerin ortadan kaldırılmasında görev yapar.

Adaptif immün sistemin antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifisiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi molekül yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olan ve olmayana

belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerinde bu evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara “hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar (PAMP)” denilmektedir (119,120,121,122). Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bunları tanıyan reseptörlere de “Pathogen Recognition Receptor (PRR)” adı verilmektedir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır (123). TLR’ler, mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen PAMP’ları tanırlar.

İlk kez 1985 yılında *Drosophila* türünde, embriyonal gelişim basamaklarında rol aldığı bilinen bir reseptör olarak tanımlanan (124,125) ve daha sonra mutant olan sineklerde fungal infeksiyonlara yatkınlık olduğu fark edilerek, immün sistem cevabında önemli fonksiyonu olduğu düşünülen reseptöre “toll” adı verilmiştir (126). Ancak 1997 yılında insan homologu tariflenmiş ve şaşırtıcı bir şekilde doğal immün sistemin parçası olduğu görülmüştür (127).

TLR’ler, ekstrasellüler domain (LRR), transmembran domain ve sitoplazmik domainden oluşan üç genel yapısal özelliğe sahiptir (122). LRR domainleri her biri 24-29 aminoasit uzunluğunda olan lösinlerin tekrarından oluşur (128), ligand bağlama ve sinyal iletiminde önemlidirler (129). Sitoplazmik sinyal domaini interleukin 1 reseptör (IL-1R) ile benzer özelliktedir ve Toll/IL-1R (TIR) domaini olarak adlandırılır. TIR domaini yaklaşık 200 aminoasit içerir ve sinyal için esastır (119, 120, 121, 122). TLR, PAMP ile bağlandığında, intrasitoplazmik TIR domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur. Bunun sonucu olarak antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler sentezlenmektedir. Bunlara ek olarak dendritik hücrelerin matürasyonu ve antijen sunum kapasitesindeki artış neticesinde, doğal immün sistem adaptif immün sistemi bir tehlikeye işaret edencesine yönlendirmektedir (130). TLR’lerin ekspresyonu sabit olmayıp patojenlere, sitokinlerin çeşitliliğine ve çevresel streslere cevapta hızla düzenlenir.

TLR’ler makrofajlar, monositler, dendritik hücreler (DC), natural killer (NK) hücreler, B hücreler, T hücrelerin spesifik tiplerinin yanında; miyofibroblastlarda, mide, ince bağırsak ve kalın bağırsakların matür ve immatür epiteliyal hücrelerinde, bağırsak submukozasının endotelial hücreleri ve adipositler gibi immün sistem hücresi olmayan hücreler üzerinde de sunulurlar (131). Değişik hücrelerde TLR

ekspresyonunun varlığı doğal immün yanıtın yanı sıra adaptif immün yanıt, inflamasyon, inflamatuvar hastalıklar, kanser ve birçok hücre yanıtında TLR'lerin rolünü vurgulamaktadır.

Bugüne kadar TLR ailesinde 13 üye saptanmıştır. Farelerle birlikte insanda 13 TLR tanımlanmasına rağmen ayrı ayrı insanda 11, farelerde 12 TLR saptanmıştır (119, 120, 121, 122). Bununla birlikte insanlarda bulunan bazı TLR'lerin karşılıkları tüm memelilerde mevcut değildir. Farelerde sunulan TLR-11, 12 ve 13'ün hiçbiri insanda gösterilememiştir. Diğer memelilerde insanda bulunmayan TLR'ler sunulabilir. Bu durum insan doğal immünitesinin modelleri olarak deneysel hayvanların kullanımını zorlaştırmaktadır (119,128,132). TLR-1, 2, 4, 5, 6 ve 10 hücre yüzeyinde sunulur ve aktivasyondan sonra fagozomlara göç eder. Halbuki TLR-3, 7, 8 ve 9 hemen hemen tüm hücre tiplerinde, özellikle endozomlar ve endoplazmik retikulum başta olmak üzere hücre içi kompartmanlarda sunulur (131). TLR'ler ligandlarının yokluğunda nonkovalent dimerler oluşturlar (133). Her bir TLR'nin ligand spesifitesi farklıdır. Bunlardan TLR1-TLR9 arası ve TLR11'in ligandları belirlenmiş; TLR10, TLR12 ve TLR13'ün ligandları ise henüz bilinmemektedir (Tablo 2).

TLR'ler hem lenfoid hem de nonlenfoid dokuda eksprese olmaktadır. Northernblot analizi ve mRNA ekspresyonuna bakılarak, TLR1'in ağırlıklı olarak monosit, nötrofil, B hücreleri ve NK hücrelerinde, TLR2'nin monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR3'ün dendritik hücrelerde, TLR4'ün endotelial hücreler, monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR5'in ise monosit ve dendritik hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir (134,135). Ancak tüm bu veriler mRNA ekspresyonu esasına dayandığı için, fonksiyonel proteininin kesin olarak varlığını gösterdiğini söylemek mümkün değildir. Ayrıca, mRNA ekspresyonu, hücre içinde mi yoksa hücre yüzeyinde mi bulunduğu ayrımını yapamamaktadır. Kısıtlı sayıda TLR antikoru bulunduğu için yüzey ekspresyonları hakkındaki bilgiler yeterli değildir (136). İnsan TLR genlerinin, kromozom 4p14 (TLR1), 4q32 (TLR2), 4q35 (TLR3), 9q32-33 (TLR4), 1q33.3 (TLR5), 4p16.1 (TLR6), Xp22.3 (TLR7), Xp22 (TLR8) ve 3p21.3 (TLR9) üzerinde olduğu gösterilmiştir (137).

TLR-2

TLR-2, 4q31-32 kromozomda kodlanan, 19 N-terminal LLR'li 784 aminoasitlik bir proteindir. 84kDa moleküler ağırlıktadır. TLR2 mRNA ekspresyonu beyin, kalp, akciğer ve dalak dokularında gözlenir ve özellikle myelomonositik orjinli periferik kan lökositlerinde (PBL) en yüksektir (138). TLR-2 kompleksleri çoğunlukla bakterilerdeki PAMP'ların geniş bir aralığını tanır. Bunlar lipoarabinomannan (LAM), lipopolisakkarid (LPS), lipoteikoik asit (LTA), peptidoglikan (PGN) ve diğer glikolipidler, glikoproteinler ve lipoproteinlerdir. TLR-2'nin ligandları tanınması ve sinyal iletimi oluşturabilmesi için diğer TLR'ler ile dimerize olması gerekmektedir. Peptidoglikan, TLR-2 ve TLR-6'nın dimer oluşturduğu reseptör aracılığı ile sinyal iletirken, lipoproteinler, TLR-6'ya ihtiyaç duymadan TLR-2'yi aktive edebilmektedir. Benzer şekilde TLR-2 ve TLR-6 birlikte mikoplazma lipoproteininin tanınması için gereklidir. Gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin lipoproteinleri tek başına TLR-2 ile tanınmaktadır (139). TLR-2 kompleksleri aynı zamanda kızamık virüs (MV), insan sitomegalovirus (HCMV) ve hepatit C virüs (HCV) gibi virüsleri ve zimosan içeren mantar PAMP'larını tanıyabilir (119,140). TLR-4 gibi TLR-2 komplekslerinin PAMP'ları tanınması ve/veya sinyal iletmesi için CD14 gerekir. TLR2 fagozomlarda toplanır ve direkt olarak hücre tarafından mikrobiyal ürünün internalizasyonunu sağlayabilir.

Tablo 2. TLR ailesi ve ligandları

TLR	Klasik ligandlar	Dağılım ve hücre lokalizasyonu	Transkripsiyon faktörleri	Sitokin indüksiyonu
TLR1	<i>Mikobakteri</i> : tri-açıl peptidler	İnsan ve farelerde sık yüzey ekspresyonu. TLR2 ile heterodimerizasyon	NF-κB	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.)
TLR2	<i>Gram-pozitif bakteri</i> : peptidoglikan, lipoprotein, ısı şok proteinleri	İnsan ve farelerde sık yüzey ekspresyonu. TLR1 ne TLR6 ile heterodimerizasyon	NF-κB	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.)
TLR3	<i>Virüsler</i> : çift sarmal DNA (dsDNA) <i>Sentetik</i> : polinosik polisitilik asid	İnsan miyeloid dendritik hücrelerde (mDC) ve fare monosit ve mesengial hücrelerde hücre içi ekspresyon	NF-κB , IRF3,7	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.), IFN-1
TLR4	<i>Gram-negatif bakteri</i> : LPS (koreseptör CD14, LBP, MD-2)	Yaygın yüzey ekspresyonu Sindirim sistemi epitelinde intrasellüler ekspresyon	NF-κB , IRF3,7	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.), IFN-1
TLR5	<i>Bakteri</i> : flagellin	Sindirim sistemi epiteli dahil insan ve farede yaygın yüzey ekspresyonu	NF-κB	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.),
TLR6	Mikoplazma: diaçil lipoproteinler	Öncelikle insan ve farede mDC, mast hücre ve B hücre yüzeyinde ekspresyon TLR2 ile heterodimerizasyon	NF-κB	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.),
TLR7	<i>Virüsler</i> : tek sarmal RNA <i>Sentetik</i> : imidazoquinolinler	İnsanlarda plasmaitoid Dendritik hücreler (pDC) ve B hücrelerde endosomal ekspresyon Farede mDCde ekspresyon	NF-κB , IRF3,7	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.), IFN-1
TLR8	<i>Virüsler</i> : tek sarmal DNA <i>Sentetik</i> : imidazoquinolinler	İnsan miyeloid, NK ve T hücrelerinde endosomal ekspresyon Farelerde fonksiyonel değil	NF-κB , IRF3,7	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.), IFN-1
TLR9	<i>Virüsler ve bakteri</i> : çift sarmal DNA <i>Sentetik</i> : CpG olidodeoksinükleotidler	İnsanlarda pDC, B hücreleri ve NK hücrelerinde endosomal ekspresyon Farelerde daha yaygın olarak doku ekspresyonu	NF-κB , IRF3,7	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.), IFN-1
TLR10	Bilinmiyor	İnsan pDC ve B hücre yüzeyinde ekspresyon Farelerde bulunmaz	Bilinmiyor	Bilinmiyor
TLR11	<i>Toxoplasma gondii</i> : profilin Üropatojen bakteri	Fare üroepitel yüzeyinde eksprese edilir İnsanlarda bulunmaz	NF-κB	İnflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6 vs.),

TLR-4

TLR-4 ilk *Drosophila Toll*'ünün insan homologu olarak tanımlanmış ve ilk insan *Toll*'u (hToll) olarak adlandırılmıştır. TLR-4, 9q32-33 kromozomda kodlanan, 22 N-terminal LLR içeren, 90 kDa moleküler ağırlığında 839 aminoasitlik bir proteindir.

TLR-1 ve TLR-6 ile yakın ilişkilidir. İn vivo olarak TLR-4 mRNA'sı tek bir transkript olarak sunulur ve en yüksek seviyelerde dalak ve PBL'ler de bulunur. TLR-4; B hücreler, DC'ler, monositler, makrofajlar, granülositler ve T hücreler tarafından sunulur (138). Bazı çalışmalarda TLR-4'ün yalnızca miyelomonositik hücrelerde sunulduğu ve mononükleer hücrelerde en yüksek olduğu belirtilmiştir (141).

TLR-4 bir homodimer oluşturur ve MD-2 ilave komponenti ile ekstrasellüler birliktelik yapar. MD-2, LPS'nin TLR-4 aracılı tanınmasında gereklidir. TLR-2 kompleksleri LPS'yi tanıyabilmesine rağmen, TLR-4 genellikle LPS reseptörü olarak düşünülür. MD-2 ve TLR-4 homodimer birlikteliği LPS'yi direkt olarak bağlamaz. LPS, ilk soluble olarak LPS bağlayan protein (LBP) ile bağlanır. LBP'de ya soluble veya glikozilfosfatidilinozitol (GPI)-bağlı CD14 ile bağlanır. Muhtemel olarak LPS tanıma kompleksi CD14, TLR-4 ve MD-2'yi içeren en az üç komplekse sahiptir. TLR-4 ve MD-2 sürekli olarak birbirleriyle birlikte iken CD14 LPS bağlandıktan sonra komplekse katılır. Kesin mekanizması henüz anlaşılmamasına rağmen LBP'nin LPS'yi CD14'e transfer ettiği ve böylece TLR-4'ün aktive olduğu düşünülmektedir (119). TLR-4 ile LPS tanınmasında CXCR4, GDF-5, CD55, çeşitli ısı şok proteinleri (HSP70, HSP90) ve kompleman reseptörlerinin (CR) gerekli olduğu düşünülmektedir (131). TLR-4 kompleksleri aynı zamanda respiratuar sinsityal virüs (RSV), hepatit C virüs ve Mouse mammary tumor virus (MMTV) gibi virüsleri tanır.

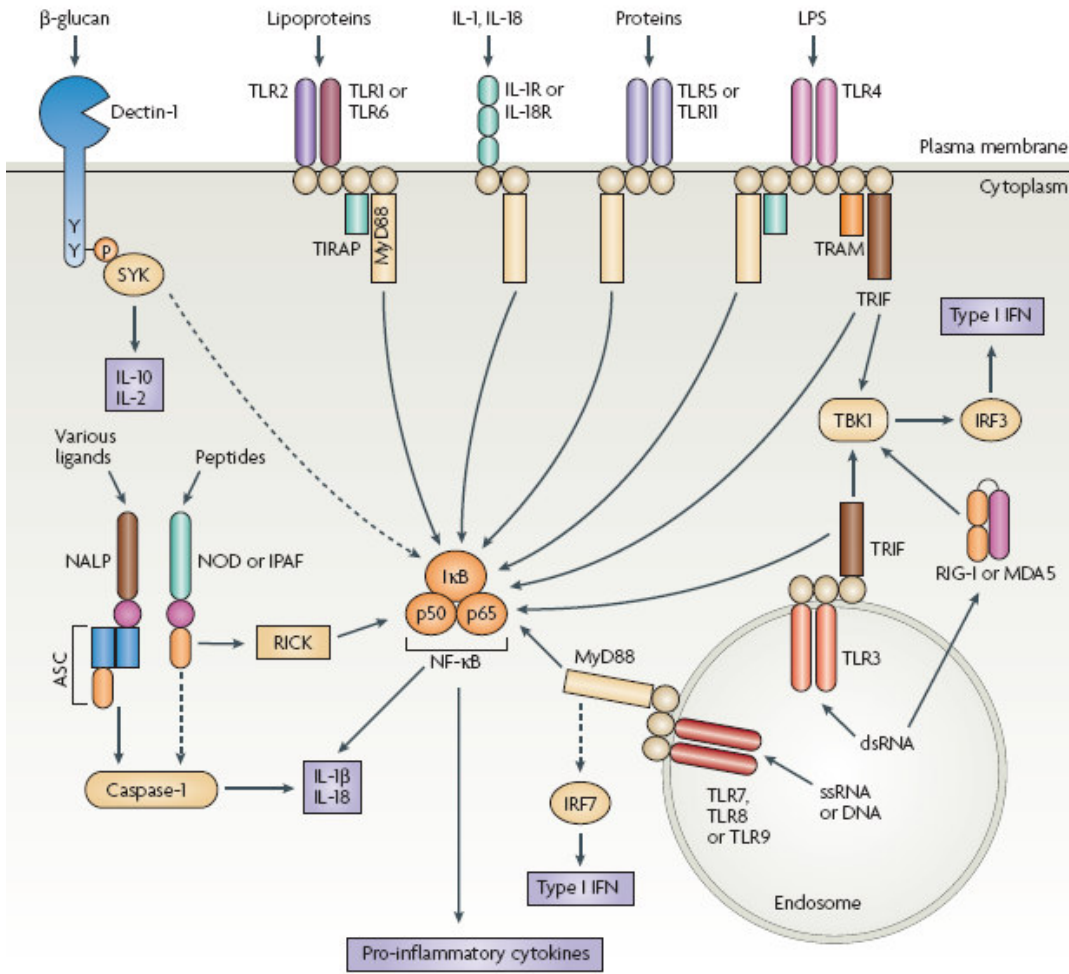
TLR-4 kompleksi; HSP'ler, fibrinojen, fibronektin, surfaktan protein A (SP-A) ve β -defensinler gibi endojen ligandları tanıyabilir (119). TLR-4 hem aktivitesini artıran TLR-5 ile ve hem de aktivitesini inhibe eden TLR-1 ile heterodimer oluşturur. TLR-4 geninde mutasyon olan C3H/HeJ türü fareler, gram negatif bakteriyel infeksiyonlara yüksek olarak hassastır. İnsan TLR-4 geninde polimorfizmler, artmış gram-negatif infeksiyon hassasiyeti ile koreledir (142). TLR-4'ün aktivasyonu NF- κ B sinyal yolu aracılığıyla edinsel immün cevaplarda çok önemli olan çeşitli sitokinlerin ve kositimülatör moleküllerin ekspresyonunu sağlar. Bu bulgular TLR'lerin doğal immün sistemin reseptörleri olarak fonksiyon görebildiğini göstermiştir (143).

TLR Sinyal Yolları

TLR'lerin dimer olarak fonksiyon yaptıklarına inanılır. Çoğu TLR'lerin homodimer olarak işlev yaptıkları görülürken, TLR-2 formları TLR-1 veya TLR-6 ile heterodimer olup her bir dimer farklı bir ligand spesifitesine sahiptir. TLR-4'ün MD-2 gerektiren LPS'nin tanınması durumunda olduğu gibi bazı TLR'lerde tam ligand hassasiyeti için diğer koreseptörler gereklidir. CD14 ve LBP'nin, LPS'nin MD-2'ye sunumunu kolaylaştırdığı bilinmektedir. TLR sinyaline aracılık eden adaptör proteinler ve kinazlar bulunur. TLR'ler aktive olduğu zaman bir sinyal üretmek için hücrenin sitoplazması içinde adaptör moleküller toplanır. Sinyalde beş adaptör molekül bulunmaktadır. Bu adaptör proteinler; MyD88, TIR domaini içeren adaptör protein (TIRAP)/MyD88-adaptorlike (Mal), TIR domain içeren adaptör protein uyaran IFN- β (TRIF)/TICAM-1, toll-receptor associated molecul (TRAM)/Tirp/TICAM-2 ve steril alfa ve armadillo motifleri (SARM) olarak bilinir (144,145,146). Bu adaptörler, hücre içinde diğer molekülleri aktive ederler ve inflamatuvar cevabı düzenleyen genlerin uyarılması veya baskılanmasına yol açarlar. Binlerce gen TLR sinyali ile aktive edilir (132,144) (Şekil 2).

Toll-like reseptör sinyal yolu; MyD88 bağımlı sinyal yolu ve MyD88 bağımsız sinyal yolu olmak üzere iki yoldan oluşmaktadır. MyD88 bağımlı sinyal yolunda; MyD88 önemli rol oynayıp bu molekül TLR'nin sitoplazmik kuyruğuyla birleşir ve uç bölgesi IRAK-1 (IL-1R ilişkili kinaz) ile homofilik etkileşimde bulunarak bu molekülü reseptöre bağlar. MyD88 bağımsız/TRIF bağımlı sinyal yol, IFN- α 'yı indüklemek için TLR3 ve TLR4 aracılı sinyal yollarını kullanır.

TLR sinyalleri, NF- κ B ve IFN regülatör faktör (IRF) içeren çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açabilir. Ardından çeşitli immün cevap genleri uyarılır. Her bir TLR, benzer sinyal yollarını aktive etmesine rağmen, bazı TLR'ler spesifik sinyal yollarını tetikler. Bu farklı indüksiyon paternleri TLR'lerin intrasitoplazmik bölgeleri ile birlikte olan sitoplazmik adaptör moleküllere bağlıdır (144,147).



Şekil 2. TLR sinyal iletim yolları

TLR, Toll-like reseptör; *MyD88*, miyeloid diferansiyasyon faktör 88; *TIRAP*, toll/interlökin (IL)-1 reseptör domain-içeren adaptör protein; *IFN*, interferon; *IRF*, IFN regülâtör faktör, *TRAM*, toll-reseptör associated molecule; *TRIF*, TIR domain içeren adaptör protein uyaran IFN-β; *ASC*, apoptosis-associated spect-like protein; *IκB*, NF-κB inhibitörü; *LPS*, lipopolisakkarid; *NOD*, nükleotid bağlayan oligomerizasyon domain; *RICK*, reseptör-interacting serine/threonine kinase; *RIG-I*, retinoic-acid inducible gene I; *TBK1*, TANK-binding kinase; *MDA5*, melanoma-differentiation-associated gene 5; *SYK*, spleen tyrosine kinase.

TLR ve AAA ilişkisi

Ailesel Akdeniz Ateşi doğal immün sistemin bir hastalığı olup, kendi kendini sınırlayan tekrarlayan ateş ve serozit atakları ile karakterize olan hereditör otoinflamatuar bir hastalıktır. MEVJ genindeki mutasyonlar AAA'ya neden olmaktadır. MEVJ geni pyrin adlı proteini kodlar. Pyrin proteini Toll –Like Reseptör sinyal sistemi,

PYD süperfamilyası, prokaspaz- 1 ile kompleks bir ilişki içerisinde. Bu ilişki sonucu lökosit apoptozu, interleükin -1 üretimi ve NF-B yolak aktivasyonu üzerinden inflamatuvar yanıtın kontrol edildiği düşünülmektedir. MEFV genindeki mutasyonlar proinflamatuvar durum ile sonuçlanmaktadır. AAA hastalarında atak sırasında olduğu gibi atak olmadığı dönemde de yüksek IL-1, IL-6 ve TNF- α düzeyleri saptanmıştır. Bu sitokinler amiloid prekürsör protein (serum amiloid A) üretimine neden olmakta ve sonuçta amiloidoz denen durum ortaya çıkmaktadır.

Doğal immün sistem patojenlere karşı konak savunmasının ilk basamağı olup makrofajlar ve dendritik hücreleri içeren fagositler aracılığıyla bu savunmayı gerçekleştirir. Doğal immünite patojen ajanları tanır, onların eradikasyonunu sağlar ve edinsel immünitenin gelişmesine katkıda bulunur. Doğal immün sistemden sorumlu hücreleri stimule eden birtakım mikrobiyal ürünler bilinmekle beraber, bu uyarıyı sağlayan reseptör aracılı stimulasyonlar Toll Like Reseptörler keşfedilene kadar bilinmiyordu. TLR; TNF- α , IL-1, IL-6, ve IL-12 gibi inflamatuvar yanıt ile ilişkili olan sitokinlerin genetik ekspresyonunu artırır. TLR-4 Gram (-) bakterilerin lipopolissakkaridlerini tanıırken TLR-2'nin doğal immün sistemde anahtar rol oynadığı düşünülür. TLR-2 Gram (+) bakterilerdeki lipoteikoik asid gibi mikrobiyal ürünleri ve endojen inflamatuvar mediatörleri tanır.

TLR fonksiyonlarını düzenleyen genetik polimorfizimlerin Th-1 (otoimmün) ve Th-2 (allerjik) hastalıklara yatkınlığı etkilediği tespit edilmiştir (148). AAA hastalarında, özellikle amiloidozu olanlarda artmış TLR-2 Arg753Gln polimorfizmi gösterilmiştir (149). Soylu A.ve ark. AAA hastalarında ve kontrol grubunda TLR-2 Arg753Gln, TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thre399Ile polimorfizm sıklığını değerlendirmişler, 2 grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptamamışlar (150).

AAA da ataklar çeşitli faktörler tarafından tetiklense de bunların birçoğu hala bilinmemektedir. Atak tetiklediği bilinen faktörler arasında fiziksel ve emosyonel stres, soğuğa maruz kalma, yağdan zengin diyet, ilaçlar, menstruel siklus, infeksiyonlar yer alır. 2005 yılında Ozel ve ark.'nın AAA tanılı hastalarda yaptıkları çalışmada Helicobacter pylori (HP) pozitif hastaların HP negatif hastalara göre daha sık ve daha şiddetli atak geçirdiklerini saptamışlar (53). F. Yalçinkaya ve ark. tarafından yapılan çalışmada AAA hastalarında ASO ve anti-DNAse B seviyelerine

bakılmış ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu izlenmiş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüş (54,55). Farklı araştırmacılar tarafından birtakım bakteriyel antijenlerin AAA hastalarında atağı tetiklediği gösterilmiş (56, 57, 58).

Soylu A. ve ark. AAA hastalarında ve kontrol grubunda bazal TLR-2 ve TLR-4 ekspresyon düzeyine bakmışlar ve iki grup arasında fark saptamamışlar. İn vitro ortamda AAA hastalarında ve kontrol grubunda lipopolissakkarit ile situmule ettikleri myeloid hücrelerde TLR-4 ekspresyonunu değerlendirmişler, hasta ve kontrol grubunda LPS maruziyet sonrası TLR-4 ekspresyon düzeyleri artmış fakat 2 grup arasında fark saptanmamış (150). Ailevi Akdeniz Ateşi'nin patogenezindeki araştırmalarda ilerleme kaydedilmesine rağmen atakların kendi kendini sınırlayan doğası ve periyoditesi hala aydınlatılamamıştır.

IV. MATERYAL METOD

HASTALAR

Ocak 2010 - Aralık 2010 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Polikliniğinde izlenmekte olan ve gönüllü istek formunu imzalayan 12'si erkek 18'i kadın yaş ortalaması 28 olan toplam 30 Ailevi Akdeniz Ateş tanılı hasta çalışmaya alındı. Tanının tüm hastalarda Tell-Hashomer kriterlerine göre konulduğu doğrulandı. Hastalardan atak sırasında ve atakdan 20 gün sonra (atak kiniğinin olmadığı dönemde) TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyi tayini için 2 cc EDTA'lı tüpe ve 8 cc düz tüp içerisine kan örneği alındı. Ayrıca atak sırasında kan kültürü, idrar kültürü ve boğaz sürüntüsü örnekleri alındı, kreatinin, C-reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), fibrinojen ve hemogram parametrelerini çalışmak amacıyla 8 cc düz, 2 cc EDTA' lı, 2,7 cc ve 1,6 cc Na sitratlı tüp için kan örneği alındı.

Her hasta için çalışma öncesinde hazırlanan bir form dolduruldu (Ek-1). Bu formlara hastaların ad-soyad, cinsiyet, hastane protokol numarası, doğum tarihi, ikametgah bilgileri, hastalık belirtilerinin başlama yaşı, hastalık tanı yaşı, atak sıklığı, hastalık başlangıç kliniği ve son ataktaki kliniği (karın ağrısı, ateş, göğüs ağrısı, artralji, artrit, miyalji, deri lezyonları), saptanmış amiloidoz varlığı, düzenli kolşisin kullanımının olup olmadığı, kolşisin kullananlarda başlama tarihi ve günlük dozu, beraber olan hastalıkları, FMF gen mutasyonu, hastaların atak sırasındaki eritrosit sedimentasyon hızları, C-reaktif protein, fibrinojen, kreatinin, hemoglobin (hb), hemotokrit (hct), lökosit, trombosit düzeyleri, atak sırasında alınan kan kültürü, idrar kültürü, boğaz sürüntüsü değerleri kaydedildi. Gebeler ve kronik otoinflamatuvar hastalığı bulunan olgular çalışma dışı bırakıldı.

Kontrol grubuna hastanede çalışan hiçbir sağlık sorunu olmayan çalışma grubundaki hastalara benzer yaş ve cinsiyet özelliklerine sahip gönüllü 20 kişi (kadın:12 erkek:8) alındı. Kontrol grubunda hemogram, sedim ve crp değerlerine bakıldı ve normal olanlar çalışmaya dahil edildi.

MOLEKÜLER TEKNİKLER

DNA Ekstraksiyonu

Roche RNA Purification kiti (kit referans no:11 828 665 001, Roche Diagnostic GmbH, Almanya) ile tam kandan RNA izolasyonu yapıldı.

cDNA sentezi

Tam kandan RNA ekstraksiyonu yapılarak elde edilen RNA lar Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti kullanılarak cDNA ya dönüştürüldü. (Cat. No. 05 081 955 001).

Prosedür

I.Aşama

Komponent	Volüm	Son Konsantrasyon
Total RNA	9,4 ul	1pg-1mikrogram
Random Hexamer Primer 600pmol/mikrolitre	2 ul	60 mikromolar
Total volüm	11,4 ul	

Denatürasyon: 10 dakika 65 C°

II. Aşama

Komponent	Volüm	Son Konsantrasyon
Reverse Transcriptase Reaction Buffer,5x kons.	4 mikrolitre	1x (8 mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor 40U/mikrolitre	0,5 mikrolitre	20U
Deoxynucleotide Mix,10 mM	2 mikrolitre	1 mM
DTT	1 mikrolitre	5mM
Reverse Transcriptase	1,1 mikrolitre	10U
Final Volume	20 mikrolitre	

Reverse Transkriptaz PCR (cDNA eldesi):10 dak 29 °C, denaturation: 5 dak 85 °C, extension: 60 dak 48 °C

Elde edilen cDNA uygun primer ve problarla PCR işlemi için hazırlandı. Prosedür aşağıdaki gibidir:

Step	İşlem										
1	Standart stabilizer solution ile fresh dilusyon serileri hazırlandı. 1:10 1:100 1:100										
2	Buz üstündeki 1,5 ml lik reaksiyon tüpüne aşağıdaki komponentler sırayla eklendi:										
	<table><tr><th>Komponent</th><th>Volüm</th></tr><tr><td>Su</td><td>6 mikrolitre</td></tr><tr><td>Light Cycler Primer Set</td><td>2 mikrolitre</td></tr><tr><td>Light Cycler FastStart DNA Master Sybr Green I</td><td>2 mikrolitre</td></tr><tr><td>Total Volüm</td><td>10 mikrolitre</td></tr></table>	Komponent	Volüm	Su	6 mikrolitre	Light Cycler Primer Set	2 mikrolitre	Light Cycler FastStart DNA Master Sybr Green I	2 mikrolitre	Total Volüm	10 mikrolitre
Komponent	Volüm										
Su	6 mikrolitre										
Light Cycler Primer Set	2 mikrolitre										
Light Cycler FastStart DNA Master Sybr Green I	2 mikrolitre										
Total Volüm	10 mikrolitre										
3	10 mikrolitrelik PCR karışımı daha önceden soğutulmuş Light Cycler kapillerlerine pipetlendi. Üzerine 10 mikrolitre cDNA template eklendi.										
4	10 mikrolitrelik PCR karışımı daha önceden soğutulmuş 4 tane kapillere pipetlendi. Üzerine dilüe edilmemiş ve edilmiş standartlar eklendi.										
5	Kapillerleri taşıyan adaptörler mikrosantrifüje konur ve 2000 rpmde 30 sn döndürüldü.										
6	Kapillerler Light cycler cihazının rotor kısmına yerleştirildi.										
7	PCR döngüsü başlatıldı.										

TLR-2 ve TLR-4 Ligh Cycler Primer Set (Lot:290807), Beta aktin (Lot: 260308)

SYBR Green I (Referans No:12 239 264 001, Lot: 1104 71 00).

PCR koşulları

Denatürasyon

Parametre	Değer
Döngü Sayısı	1
Tipi	Regular
Temp. Targets	Segment 1
Target Temperature	95
İnkübasyon zamanı	10:00
Temp. Transition Rate (derece/s)	20

Amplifikasyon

Parametre	Değer		
Döngü Sayısı	35		
Tipi	Kantitasyon		
Temp. Targets	Seg.1	Seg.2	Seg.3
Target Temperature	95	68	72
İnkübasyon zamanı	10	10	16
Temp. Transition Rate (derece/s)	20	20	20
Secondary Target Temp.	0	58	0
Step size	0	0,5	0
Step Delay	0	1	0
Aquisition Mode	None	None	Single
Gains	F1=5		

Melting-Curve Analizi

Parametre	Değer		
Döngü Sayısı	1		
Tipi	Melting Curve		
Temp. Targets	Seg.1	Seg.2	Seg.3
Target Temperature	95	58	95
İnkübasyon zamanı	0	10	0
Temp. Transition Rate (derece/s)	20	20	0.1

Soğuma

Parametre	Değer
Döngü Sayısı	1
Tipi	Regular
Temp. Targets	Segment 1
Target Temperature	40
İnkübasyon zamanı	30
Temp. Transition Rate (derece/s)	20

Bu işlemler TLR-2, TLR-4 ve beta aktin için ayrı ayrı gerçekleştirilerek TLR2/b-aktin oranı ve TLR4/b-aktin oranı hesaplanarak TLR2 ve TLR4 ekspresyon düzeyleri elde edilmiştir.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapıldı (SPSS 15.0, Lead Technologies Inc. 2000, ABD). Grupların karşılaştırıldığı tablolardaki verilerin değerlendirilmesinde Chi-Square ve Fisher Exact test kullanıldı. Parametrik verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermedikleri ve vaka sayısı az olduğu için Mann Whitney-U testi kullanıldı. Parametrik ölçümler arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile Sperman's korelasyon analizi uygulandı. P değerinin 0,05'in altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

V. BULGULAR

Çalışmaya AAA tanılı 30 hasta alındı. Bu hastaların %40'nı (n=12) erkek, %60'ını (n=18) kadın hasta oluşturmaktaydı. Hastaların yaş ortalaması $28,4 \pm 8,4$ yıl saptandı. Kontrol grubuna çalışma grubundaki hastalara benzer yaş ve cinsiyet özelliklerine sahip 20 sağlıklı gönüllü dahil edildi (kadın:12 erkek:8, yaş ortalaması: $26,9 \pm 6,7$). Hastalar ve kontrol grubu arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Hastalığın ortalama başlangıç yaşı $17,3 \pm 9,5$ yıl ve tanı konma yaşı $24,4 \pm 9$ yıl, hastalık süresi $11,1 \pm 8,4$ yıl olarak bulunmuştur. Hastaların %33,3 (10 hasta) ünde şikayetler 20 yaş ve üzerinde başlamışken, %63,3'ünde (19 hasta) tanı 20 yaşından sonra konmuştur. Hastaların yaş ortalamaları, hastalık başlangıç yaşı ortalamaları, tanı konulma yaşı ortalamaları Tablo 3, Tablo 4 ve Şekil 4 de gösterilmiştir.

Tablo 3. Hastalarımızın yaşları ile başlangıç ve tanı yaşlarının ortalamaları

Özellik	Yaş Ortalaması
Çalışma anındaki yaşı	$28,4 \pm 8,4$ yıl
Şikayetlerin başlama yaşı	$17,3 \pm 9,5$ yıl
Tanı alma yaşı	$24,4 \pm 9$ yıl

Tablo 4. Hastalık başlangıç ve tanı konulma yaşı dağılımları

	Başlangıç yaşı		Tanı yaşı	
	N	%	N	%
<10 yaş	8	26,7	1	3,3
10-19 yaş	12	40	10	33,3
20 yaş ve üzeri	10	33,3	19	63,4

Hastaların şikayetlerinin başlangıcındaki ve son ataktaki klinik özellikleri kaydedildi. Ataklarda en sık semptomun karın ağrısı ve ateş olduğu saptandı. Bu klinik özelliklerin sıklıkları Tablo 5 de gösterilmiştir. Amiloidoz bir hastada mevcuttu. Kolşisin kullanımlarına bakıldığında hastaların %73,3 'ü (n=22) kolşisin kullanmakta olup bunlarında %30'u (n=9) düzensiz olarak kullanmaktaydı. Hastaların %26,7'i (n=8) hiç kolşisin kullanmıyordu.

Tablo 5. Başlangıç ve ataklardaki klinik özelliklerin sıklıkları

Klinik	Başlangıç % (n)	Atakta % (n)
Ateş	%83,3 (25)	%83,3 (25)
Karın ağrısı	%93,3 (28)	%96,6 (29)
Göğüs ağrısı	%30 (9)	%13,3 (4)
Artralji	%56,6 (17)	%33,3 (10)
Artrit	%16,6 (5)	%0 (0)
Miyalji	%36,6 (11)	%10 (3)
Cilt lezyonu	% 6,6 (2)	%3,3 (1)

Hastalarımızın laboratuvar parametrelerini değerlendirirken her parametre için sınır değerler belirlenip düşük, normal, yüksek olanların sıklıkları tespit edildi. (Tablo 6). Sınır değerler CRP <0,5 mg/dl, ESR<20 mm/saat, fibrinojen 400 mg/dl, kreatinin 1,1 mg/dl, lökosit 4000-10000/ mm³, hemoglobin 12-14g/dl, hct %36-44, plt 150.000-400.000/mm³ olarak belirlendi. Atak sırasında hastaların ortalama inflamatuvar yanıt göstergeleri Tablo 6'da gösterilmiştir. Atak sırasında alınan kan kültürleri ve boğaz sürüntülerinde üreme saptanmadı. İdrar kültürlerinde ise sadece bir hastada E.Coli üremesi oldu. Bir hastada da atak sırasında diş infeksiyonu mevcuttu.

Tablo 6. Atak sırasında laboratuvar parametrelerinin değerlendirilmesi

	Ortalama Değerler	Yüksek		Normal		Düşük		Total
		n	%	n	%	n	%	
CRP	4.9 ± 5.5 mg/dl	21	70	9	30	0	0	30
Fibrinojen	474 ± 96 mg/dl	23	76,7	7	23,3	0	0	30
Kreatinin	0.70±0.16mg/dl	0	0	30	100	0	0	30
ESR	15.7±19.74mm/saat	12	40	18	60	0	0	30
Lökosit	9638 ± 3351/mm3	14	46,7	16	53,3	0	0	30
Hemoglobin	12.5±1.7g/dl	0	0	10	33,3	20	66,7	30
Hematokrit	%38,2 ± 4,3	0	0	10	33,3	20	66,7	30
Trombosit	212000±72726/mm3	1	3,3	24	80	5	16,7	30

Atak sıklıklarına bakıldığında hastaların %80'inin 3 aydan daha kısa sürede ataklarının tekrarladığı görüldü (Tablo 7).

Tablo 7. Atak sıklığının değerlendirilmesi

Atak sıklığı	n	%
<3 ay	24	80
3-6 ay	3	10
>6 ay	3	10

Hastaların %80'inde (n=24) en az bir mutasyon saptandı. En sık %33,3 (n=10) oranında M694V heterozigot mutasyonu görülmüştür. Hastaların %20'sinde (n=6) mutasyon saptanmamıştır. Hastalarımızda saptanan mutasyonların sıklıkları Tablo 8 de gösterilmiştir.

Tablo 8. MEFV geninde sık görülen mutasyonlardan saptananlar

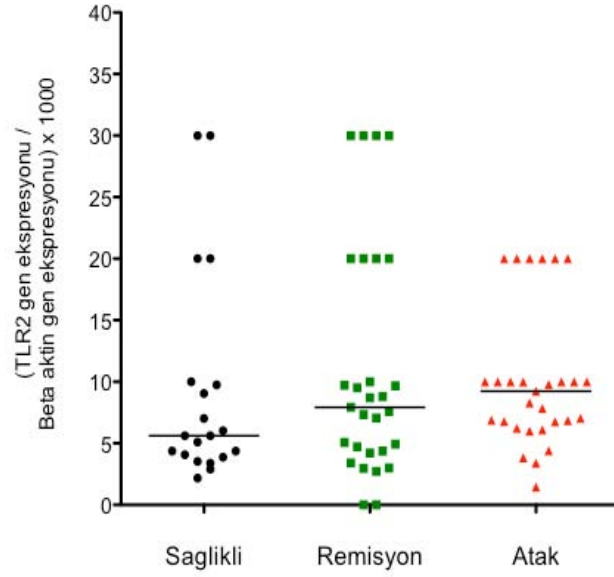
Mutasyon	Heterozigot		Homozigot		Yok	
	(n)	%	(n)	%	(n)	%
M694V	10	33,3	5	16,7	15	50
E148Q	8	26,7	0	0	22	73,3
F479L	1	3,3	0	0	29	96,7
M680I (G/C)	2	6,7	2	6,7	26	86,6
V726A	5	16,7	0	0	25	83,3
A744S	1	3,3	0	0	29	96,7
R202Q	1	3,3	0	0	29	96,7

Çalışmaya alınan 30 hastada atak sırasında ve ataktan 20 gün sonra (atak semptomlarının olmadığı dönemde) TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerine bakıldı ve kontrol grubundaki bireyler ile karşılaştırıldı. Üç grup arasında TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Üç grubun ortalama TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri Tablo 9 da verilmiştir. Hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda Toll-like reseptör gen ekspresyon düzeyleri Şekil 3 ve 4 de gösterilmiştir.

Tablo 9. Toll-like reseptör gen ekspresyon düzeyleri ($\times 10^{-3}$)

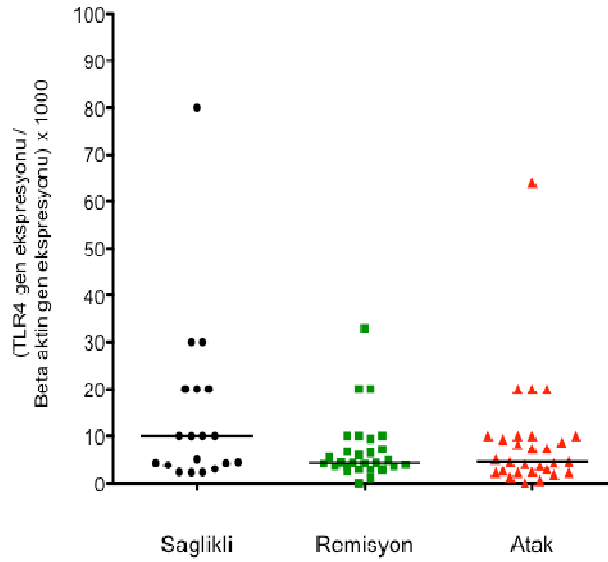
	FMF Akut Atak	FMF Remisyon	Sağlıklı Kontrol
TLR-2 (ortalama$\pm$SD) * (ortanca) (alt-üst sınır)	10 $\pm$ 5,6 9,2 (1,4–20)	11 $\pm$ 9,5 7,9 (0–30)	9,3 $\pm$ 8,6 5,6 (2,1–30)
TLR-4 (ortalama$\pm$SD) * (ortanca) (alt-üst sınır)	28,4 $\pm$ 117,7 4,6 (0–640)	120 $\pm$ 615,4 4,4 (0–3320)	14,2 $\pm$ 18,3 9,9 (2,1–80)

*Rakamlar 10^{-3} ile çarpılacak



Şekil 3. TLR-2 gen ekspresyonu

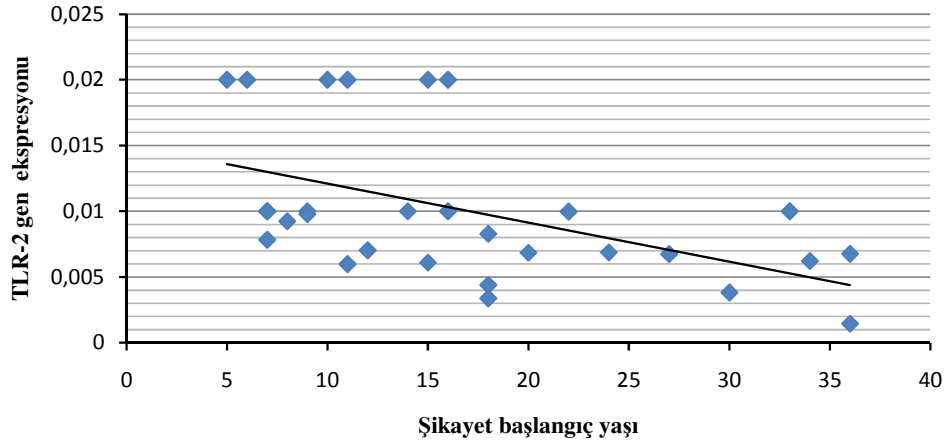
(Yatay çizgi ortanca değeri göstermektedir)



Şekil 4. TLR-4 gen ekspresyonu

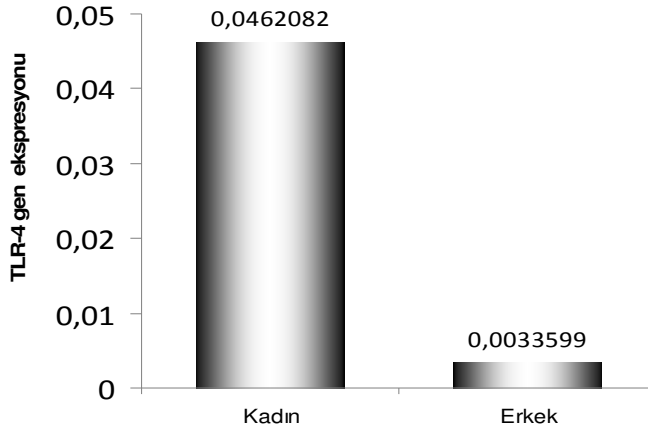
(Yatay çizgi ortanca değeri göstermektedir)

Hastalarda atağın olmadığı dönemdeki TLR-2 gen ekspresyon düzeyleri ile TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri birbiriyle koreleydi. Şikayet başlangıç yaşı ile ataktaki TLR-2 gen ekspresyon düzeyleri arasında negatif korelasyon bulundu ($p<0,05$) (Şekil 5).



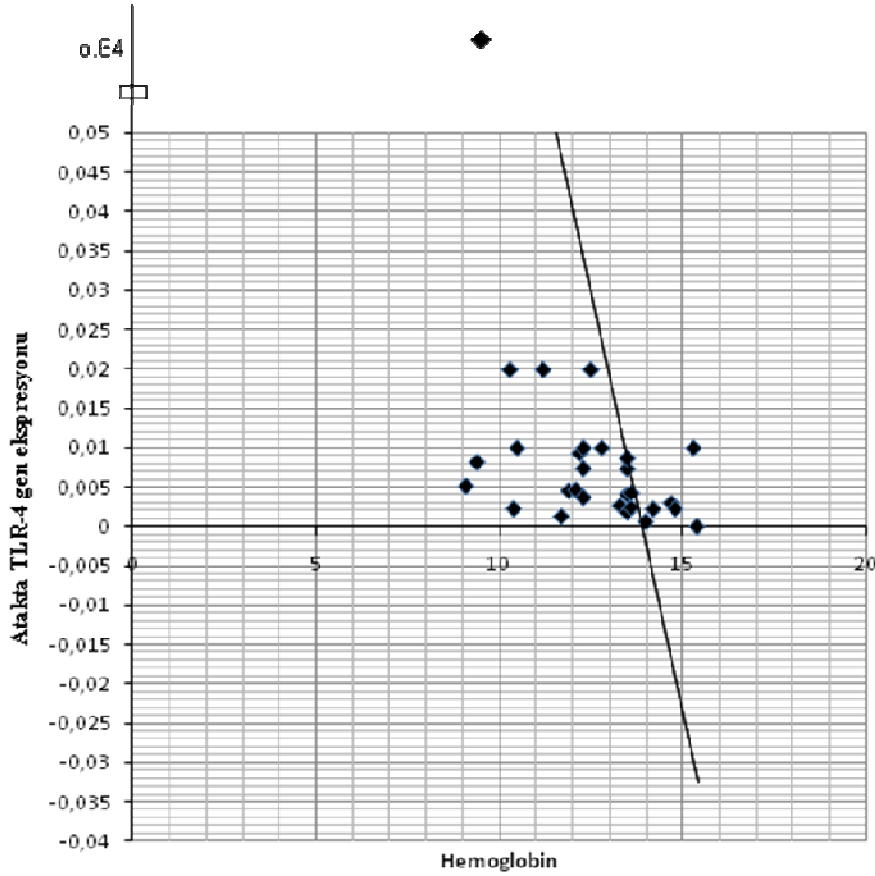
Şekil 5. AAA da ataktaki TLR-2 gen ekspresyonu ve şikayet başlangıç yaşı

Kadın hastalarda atak sırasındaki TLR-4 gen ekspresyonu erkek hastalara göre daha yüksek saptandı ($p<0,05$) (Şekil 6).



Şekil 6. AAA da ataktaki TLR-4 gen ekspresyonu ve cinsiyet

Atak sırasındaki TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri ile hemoglobin ve hematokrit düzeyleri arasında negatif koralasyon mevcuttu ($p<0,05$) (Şekil 7).



Şekil 7. AAA da ataktaki TLR-4 gen ekspresyonu ve hemoglobin değerleri

M694V mutasyonu olan olgularda atak sırasında CRP ve fibrinojen düzeylerinin daha yüksek olduğu görüldü ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

Kolşisin kullananlar ile kullanmayanlar arasında atak sırasında TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0,05$).

Atak sırasındaki TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri ile atak sırasında bakılan CRP, ESR, fibrinojen, lökosit, trombosit düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki gözlenmedi ($p>0,05$).

MEFV gen mutasyon tipleri ile atak sırasında ve ataksız dönemdeki TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$).

Sonuç olarak AAA hastalarında atak sırasında ve ataksız dönemde TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında bir ilişki gözlenmedi. Remisyonda bakılan TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri birbiriyle korele saptandı ($p<0,05$). Kadın hastalarda atak sırasındaki TLR-4 gen ekspresyonunun erkek hastalara göre daha yüksek olduğu izlendi ($p<0,05$). Ataktaki TLR-2 gen ekspresyonu ile şikayetlerin başlama yaşı arasında ve TLR-4 gen ekspresyonu ile hemoglobin ve hematokrit değerleri arasında negatif korelasyon saptandı ($p<0,05$).

VI. TARTIŞMA

Doğal immün sistem patojenlere karşı konak savunmasının ilk basamağı olup makrofajlar ve dendritik hücreleri içeren fagositler aracılığıyla bu savunmayı gerçekleştirir. Doğal immünite patojen ajanları tanır, onların eradikasyonunu sağlar ve edinsel immünitenin gelişmesine katkıda bulunur. Doğal immün sistemden sorumlu hücreleri situmule eden birtakım mikrobiyal ürünler bilinmekle beraber, bu uyarıyı sağlayan situmulasyonlar Toll-like reseptörler keşfedilene kadar bilinmiyordu. TLR; TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-12 gibi inflamatuvar yanıt ile ilişkili olan sitokinlerin genetik ekspresyonunu artırır.

Bugüne kadar TLR ailesinde 13 üye saptanmıştır. TLR-4 Gram (–) bakterilerin lipopolissakkaridlerini tanıırken TLR-2'nin doğal immün sistemde anahtar rol oynadığı düşünülür. TLR-2 Gram (+) bakterilerdeki lipoteikoik asid gibi mikrobiyal ürünleri ve endojen inflamatuvar mediatörleri tanır. TLR'ler yalnızca mikrobiyal yapılara hassas olmayıp küçük molekül ağırlıklı sentetik bileşiklerle ve endojen moleküllerle de aktive edilebilirler. Bu durumda sadece antimikrobiyal immünitede değil aynı zamanda otoimmün hastalıkların (sistemik lupus eritematozis, romatoid artrit gibi) patogeneğinde de rol aldıkları gösterilmiştir.

Ailesel Akdeniz Ateşi doğal immün sistemin bir hastalığı olup, kendi kendini sınırlayan tekrarlayan ateş ve serozit atakları ile karakterize olan herediter otoinflamatuvar bir hastalıktır. MEV genindeki mutasyonlar AAA'ya neden olmaktadır. MEV geni pyrin adlı proteini kodlar. Pyrin proteini; Toll-like reseptör sinyal sistemi, PYD süperfamilyası, prokaspaz-1 ile kompleks bir ilişki içerisinde. Bu ilişkinin lökosit apoptozunu, interlökin-1 üretimini ve NF- κ B yolak aktivasyonu üzerinden inflamatuvar yanıtı kontrol ettiği düşünülmektedir. MEV genindeki mutasyonlar proinflamatuvar durum ile sonuçlanmaktadır.

AAA da ataklar çeşitli faktörler tarafından tetiklense de bunların birçoğu hala bilinmemektedir. Atağı tetiklediği bilinen faktörler arasında fiziksel ve emosyonel stres, soğuğa maruz kalma, yağdan zengin diyet, ilaçlar, menstruel siklus, infeksiyonlar yer alır. Bir takım bakteriyel antijenlerin farklı araştırmacılar tarafından AAA hastalarında atağı tetiklediği gösterilmiştir (56, 57, 58). Ataklar sırasında gelişen

inflamasyonun başlamasında TLR uyarılamalarının rolü olabilir. Bu durumda FMF atakları ile TLR ekspresyonu arasında ilişki görülmesi beklenebilir. Soylu A. ve ark. AAA hastalarında ve kontrol grubunda bazal TLR-2 ve TLR-4 ekspresyon düzeyine bakmışlar ve iki grup arasında fark saptamamışlardır. İn vitro ortamda AAA hastalarında ve kontrol grubunda lipopolissakkarit ile situmule ettikleri myeloid hücrelerde TLR-4 ekspresyonunu değerlendirmişler, hasta ve kontrol grubunda LPS maruziyet sonrası TLR-4 ekspresyon düzeyleri artmış fakat 2 grup arasında fark saptanmamış (150). Ailevi Akdeniz Ateşi'nin patogeneziindeki araştırmalarda ilerleme kaydedilmesine rağmen atakların kendi kendini sınırlayan doğası ve periyoditesi hala aydınlatılamamıştır.

AAA hastalarında, özellikle amiloidozu olanlarda artmış TLR-2 Arg753Gln polimorfizmi gösterilmiştir (149). Soylu A. ve ark. AAA hastalarında ve kontrol grubunda TLR-2 Arg753Gln, TLR-4 Asp299Gly ve TLR-4 Thre399Ile polimorfizm sıklığını değerlendirmişler, 2 grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptamamışlardır.

AAA ve TLR ile ilişkisini inceleyen araştırmalar polimorfizm çalışmalarıdır. Ekspresyon düzeyi gösterilmeden yapılmış olan polimorfizm çalışmalarının sonuçlarının ne kadar doğru olarak değerlendirileceği tartışmaya açıktır. AAA hastalarında TLR ekspresyon düzeyi bakılmadan TLR'lerle ilgili birtakım polimorfizmlerin gösterilmiş olması hastalık ve atak patogeneziini açıklamak için yetersizdir. Bizim çalışmamız bu konuda ataklar ve remisyonlardaki farklılıkları araştırması bakımından özgün bir araştırmadır.

Biz bu çalışmada AAA hastalarında atak etiyolojisinde yer aldığı düşünülen infeksiyonların etki mekanizmasında yer alan TLR -2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerini atak sırasında ve atak sonrasında ölçerek sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırdık. Çalışmaya alınan 30 hastada atak sırasında ve ataktan 20 gün sonra (atak semptomlarının olmadığı dönemde) TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerine bakıldı ve kontrol grubundaki bireyler ile karşılaştırıldı. AAA hastalarında atak sırasında ve remisyon döneminde TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerini sağlıklı kontrol grubundan farklı bulmadık ($p>0,05$). Ataklar sırasındaki ekspresyon düzeyleri de remisyon dönemlerinden farklı değildi ($p>0,05$). Hastalarda atak

sırasında ve ataksız dönemde TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark çıkmamasının olası nedenleri 1- Atak nedenleri infeksiyon dışı faktörler olabilir ve bu nedenle her üç grup arasında fark tespit edilmeyebilir. Nitekim AAA ataklarını tetikleyen faktörler arasında infeksiyonlar nadiren yer almaktadır. 2- AAA hastalarında TLR-2 ve TLR-4 dışı birtakım inflamatuvar yolaklar aktive oluyor olabilir. Ataklar sırasında bir takım inflamatuvar mediatörlerin ekspresyon ve salınımının arttığı kesin olmakla beraber bu yolakların muhtemelen TLR ekspresyonu ile bir ilişkisi yoktur. Literatürde bu verileri karşılaştıracak herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Ataksız dönemde AAA hastalarında TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında pozitif korelasyon mevcut olup ($p=0,002$) atak döneminde aralarında bir korelasyon tespit edilememiştir. Atak nedeni olabilecek infeksiyon etiolojilerinin farklı olması veya farklı immün uyarıların olması atak sırasındaki farklı ekspresyon düzeylerine sebep olabilir. Biz çalışmamızda tüm hastalarımızdan atak sırasında aldığımız kan, idrar ve boğaz kültürü örneklerinden sadece bir hastada idrar kültüründe E.Coli üremesi tesbit ettik ve bir hastamızda da atak sırasında diş infeksiyonu saptadık. İnfeksiyon saptanan hasta sayısı az olduğu için bu hastalarda TLR ekspresyon düzeylerini değerlendirmek için ayrı bir gruplandırma yapılmadı. 2005 yılında Ozel ve ark.'nın AAA tanılı hastalarda yaptıkları çalışmada *Helicobacter pylori* pozitif hastaların HP negatif hastalara göre daha sık ve daha şiddetli atak geçirdiklerini saptamışlar (53). F. Yalçinkaya ve ark.'nın yaptıkları çalışmada AAA hastalarında ASO ve anti-DNAse B seviyelerine bakılmış ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu izlenmiş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüş (54). Bu hastalarda TLR ekspresyon düzeyleri incelenmemiştir.

Hastalık başlangıç yaşı ile atak sırasında TLR-2 ekspresyon düzeyi arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hastalık süresi ne kadar uzun ise atak sırasında TLR-2 ekspresyon düzeyi orantılı olarak yüksek bulunmuştur. Ataklarda daha yüksek TLR-2 gen ekspresyonu olan hastalarda klinik bulgular daha erken yaşta çıkıyor olabilir. Bu konuda literatürde yapılmış herhangi bir çalışma yoktur.

Kadın hastalarda atak sırasında TLR - 4 ekspresyon düzeyi daha yüksek tespit edildi. Oferektomili micelerde yapılan çalışmada lipopolissakkarit uygulama

sonrası 17 β -estradiol verilen grupta daha yüksek TLR-4 ekspresyonu saptanmış (151). Bu durum bayanlarda atak sırasında neden daha yüksek TLR-4 gen ekspresyon düzeyi olduğunu açıklayabilir. Bu konuda daha detaylı çalışmalar yapılmasıyla bu durum daha net açıklanabilir.

Atak sırasındaki TLR-2 ve TLR-4 ekspresyon düzeyleri ile atak sırasında bakılan CRP, ESR, fibrinojen, lökosit, trombosit düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Akut faz reaktanları çeşitli immün uyarıların sonunda artan nonspesifik göstergelerdir. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi TLR-2 ve TLR-4 ekspresyonlarının AAA atakları sırasındaki immün aktivasyonla bir ilişkisi yoktur. Doğal olarak artan akut faz reaktanları ile de bir ilişki olması beklenmemektedir. Daha geniş hasta grupları ile yapılacak çalışmalar bu konuya ışık tutabilir.

VII. ÖZET

ABSTRACT

Introduction

The role of TLR's in FMF disease which is thought to be not influenced by external antigens, are unidentified. The aim of the study is to evaluate the TLR-2 and TLR-4 gene expression levels during the attacks and out of attack periods in FMF patients for to illuminate the nature of attacks.

Material and Method

The study included 30 patients (18 female, 12 male) who were diagnosed with FMF and 20 healthy volunteers. TLR-2 and TLR-4 gene expressions were measured during acute attack and after twenty days the attack and in control subjects. TLR gene expression levels are measured by comparing Beta Actin gene expressions using Light Cycler device (Roch Diagnostic, model: LC version 3.0, serial number: 1400933).

Results

There was no statistically significant difference between three groups (during attack, out of attack and healthy controls) according to TLR -2 and TLR- 4 gene expression levels ($p>0,05$) .

Discussion

In conclusion, with the light of our results we could say that there was not a correlation between TLR-2 and TLR-4 gene expression levels and FMF disease and its attacks. The other components of immune system probably take part in FMF attacks.

Giriş

Toll Like Reseptörler (TLR) doğal immün sistemin bir parçasıdır. Bugüne kadar TLR ailesinde 13 üye saptanmıştır. TLR-4 Gram (–) bakterilerin lipopolissakkaridlerini tanıırken, TLR-2 Gram (+) bakterilerdeki lipoteikoik asid gibi mikrobiyal ürünleri ve endojen inflamatuvar mediatörleri tanıır. AAA'nin patogeneziindeki araştırmalarda ilerleme kaydedilmesine rağmen atakların kendi kendini sınırlayan doğası ve periyoditesi hala aydınlatılamamıştır. Eksternal bir

antijenin etkisi olmadığı düşünölen AAA hastalığında doğal immün sistemin en önemli elemanlarından olan TLR'lerin rolü bilinmemektedir. Bu çalışmadaki amacımız AAA tanılı hastalarda atak sırasında ve ataksız dönemde TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerini değerlendirek atakların doğasına ışık tutmaktır.

Materyal ve Metod

Çalışmaya EÜTF Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında AAA tanısıyla izlenmekte olan 30 hasta (18 bayan, 12 erkek) dahil edildi. AAA atağı sırasında akut inflamatuvar yanıtı değerlendirmek için C-reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), fibrinojen, lökosit düzeyleri bakıldı ve kan, idrar ve boğaz kültürleri yapıldı. Akut atak sırasında Light Cyclor cihazı (Rosh Diagnostik, model: LC versiyon 3.0, seri no: 1400933) kullanılarak Real time PCR yöntemi ile Beta Aktin geni ekspresyonları ile mukayese edilmek suretiyle TLR-2 ve TLR- 4 gen ekspresyonları ölçüldü. Akut ataktan 20 gün sonra (atağın olmadığı dönemde) bazal inflamatuvar yanıtı değerlendirmek için tekrar TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Sağlıklı kontrol grubu olarak 20 gönüllü çalışmaya alındı ve TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıklar Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı ve $p<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Hastalığın ortalama başlangıç yaşı $17,33 \pm 9,5$ yıl ve tanı konma yaşı $24,4 \pm 9$ yıl olarak bulunmuştur. Hastaların ortanca TLR-2 gen ekspresyon düzeyleri atak sırasında $9,2 \times 10^{-3}$ (alt-üst sınır: $1,4 \times 10^{-3}$ – 20×10^{-3}), ataktan 20 gün sonra $7,9 \times 10^{-3}$ (alt-üst sınır: 0 – 30×10^{-3}), sağlıklı kontrol grubunda ise $5,6 \times 10^{-3}$ (alt-üst sınır: $2,1 \times 10^{-3}$ – 30×10^{-3}) saptandı. Ortanca TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri atak sırasında $4,6 \times 10^{-3}$ (alt-üst sınır: 0 – 640×10^{-3}), ataktan 20 gün sonra $4,4 \times 10^{-3}$ (alt-üst sınır: 0 – 3320×10^{-3}), sağlıklı kontrol grubunda ise $9,9 \times 10^{-3}$ (alt-üst sınır: $2,1 \times 10^{-3}$ – 80×10^{-3}) saptandı. Üç grup arasında TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Ataktan 20 gün sonra bakılan TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri birbiriyle korele saptandı ($p<0,05$). Kadın hastalarda atak sırasındaki TLR-4 gen ekspresyonun erkek hastalara göre daha yüksek olduğu

izlendi ($p<0,05$). Ataktaki TLR-2 gen ekspresyonu ile şikayetlerin başlama yaşı arasında ve TLR-4 gen ekspresyonu ile hemoglobin ve hematokrit değerleri arasında negatif korelasyon saptandı ($p<0,05$).

Tartışma

AAA hastalarında atak sırasında ve remisyon döneminde TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerini sağlıklı kontrol grubundan farklı bulmadık ($p>0,05$). Ataklar sırasındaki ekspresyon düzeyleri de remisyon dönemlerinden farklı değildi ($p>0,05$). Hastalarda atak sırasında ve ataksız dönemde TLR-2 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark çıkmamasının olası nedenleri 1- Atak nedenleri infeksiyon dışı faktörler olabilir ve bu nedenle her üç grup arasında fark tespit edilmeyebilir. Nitekim AAA ataklarını tetikleyen faktörler arasında infeksiyonlar nadiren yer almaktadır. 2- AAA hastalarında TLR-2 ve TLR-4 dışı birtakım inflamatuvar yolaklar aktive oluyor olabilir. Ataklar sırasında bir takım inflamatuvar mediatörlerin ekspresyon ve salınımının arttığı kesin olmakla beraber bu yolların muhtemelen TLR ekspresyonu ile bir ilişkisi yoktur. Literatürde bu verileri karşılaştıracak herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Atak sırasındaki TLR-2 ve TLR-4 ekspresyon düzeyleri ile atak sırasında bakılan CRP, ESR, fibrinojen, lökosit, trombosit düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Akut faz reaktanları çeşitli immün uyarıların sonunda artan nonspesifik göstergelerdir. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi TLR-2 ve TLR-4 ekspresyonlarının AAA atakları sırasındaki immün aktivasyonla bir ilişkisi yoktur. Doğal olarak artan akut faz reaktanları ile de bir ilişki olması beklenmemektedir. Daha geniş hasta grupları ile yapılacak çalışmalar bu konuya ışık tutabilir.

Ek-1

Olgu Rapor Formu

- Olgu no: _____ Tarih: / /
- Protokol: _____
- Ad Soyad: _____ Cinsiyet: _____ Doğum Tarihi: _____
- Doğum Yeri: _____ Adres: _____ Tel: _____
- Hastalık Başlangıç Kliniği:
 - Ateş: _____ Karın ağrısı: _____ Göğüs Ağrısı: _____
 - Atralji: _____ Artrit: _____ Miyalji: _____
 - Deri Lezyonları: _____
- H. Başlangıç Yaşı: _____ Tanı Yaşı: _____ Atak Sıklığı: _____
- Kolşisin Başlama Tarihi: _____ Kolşisin dozu (düzenli/düzensiz): _____
- Saptanmış Amiloidoz: _____ FMF Mutasyonu: _____ Ek Hastalık: _____
- Şikayeti:
 - Ateş: _____ Karın ağrısı: _____ Göğüs Ağrısı: _____
 - Atralji: _____ Artrit: _____ Miyalji: _____
 - Deri Lezyonları: _____
- Enfeksiyon: _____
- Laboratuvar Bulguları
 - CRP: _____ Sedimentasyon _____ Fibrinojen: _____ Kreatinin: _____
 - Hg: _____ Htc: _____ Lökosit: _____ Trombosit: _____

Kan kültür:

İdrar kültür:

Boğaz sürüntü:

VIII. KAYNAKLAR

1 Bagci S, Toy B, Tuzun A, et al. Continuity of cytokine activation in patients with Familial Mediterranean Fever. Clin Rheumatol. 2004;23: 333–337.

2 Onen F. Familial Mediterranean fever. Rheumatol Int 2006;26: 489–96.

3 The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. Cell 1997;90: 797–807

4 The French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. Nat Genet 1997;17: 25–31

5 Centola M., G. Wood, D.M. Frucht, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. Blood 2000;95: 3223–3231.

6 Toubi E, Gershoni-Baruch R, Kuten A. Cisplatin treatment triggers familial Mediterranean fever attacks. Tumori 2003;89: 80-81.

7 Ben-Chetrit E, Ben-Chetrit A. Familial Mediterranean fever and menstruation. BJOG 2001;108:403-7.

8 Takeda K. , and S. Akira. Toll-like receptors in innate immunity. Inter Immunol 2005;17: 1–14.

-
- 9 Schroder N.W.J. , and R.R. Schumann. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *The Lancet Infectious Diseases* 2005;5: 156–164.
- 10 Davtyan TK, Hakobyan GS, Avetisyan SA, Harutyunyan VA. Engaging anti inflammatory mechanisms and triggering inflammatory effector apoptosis during Familial Mediterranean Fever attack. *Inflamm Res* 2008; 57: 65–74.
- 11 Schwabe AD, Peters RS. Familial Mediterranean Fever in Armenians. Analysis of 100 cases. *Medicine (Baltimore)* 1974;69: 453-62.
- 12 Siegal S. Benign paroxysmal peritonitis. *Ann Intern Med.* 1945;23: 1-21.
- 13 Mamou H, Cattani R. La maladie periodique (sur 14 cas personnels dont 8 compliques de nephropathies). *Sem Hop Paris* 1952; 28: 1062-1070.
- 14 Marmarali A. Garip bir karın sendromu. *Türk Tıp Cemy Mecm* 1946;12: 436-443
- 15 Doganavsargil E, Gümüşdis G. Ailesel Akdeniz Atesi.Klinik Romatoloji El Kitabı 2003;541-57.
- 16 Ritis K, Giaglis S, Spathari N, et al. Non-isotopic RNase cleavage assay for mutation detection in MEFV, the gene responsible for Familial Mediterranean Fever, in a cohort of Greek patients. *Ann Rheum Dis* 2004;63: 438-43.
- 17 Oberkanins C, Weinhausel A, Kriegshauser G, et al. Genetic testing for Familial Mediterranean Fever in Austria by means of reversehybridization teststrips. *Clin Chem* 2003;49: 1948-50.
- 18 La Regina M, Nucera G, Diaco M, et al. Familial Mediterranean Fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet* 2003;11: 50-6.

19 Mansour I, Delague V, Cazeneuve C, et al. Familial Mediterranean Fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Maronites, Greek orthodoxes, Greek catholics, Syriacs and Chiites and for an association between amyloidosis and M694V and M694I mutations. *Eur J Hum Genet* 2001;9: 51-5.

20 Yoshida K, Kanaoka S, Kajimura M, et al. A Japanese case of Familial Mediterranean Fever with family history demonstrating a mutation in MEFV. *Intern Med* 2003;42: 761-4.

21 Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, et al. Familial Mediterranean Fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet* 2001;9: 634-7

22 Tunca M. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: Results of a Nationwide Multicenter Study. *Medicine Baltimore* 2005 ;84:1-11.

23 John Meyerhoff, MD, Article Last Updated: Nov 13, 2009

24 Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brot TM, Frucht DM, Askentijevich I, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalises with actin filaments. *Blood* 2001;98: 85.

25 Bernot A, da Silva C, Petit J.L., Cruaud C, Caloustian C, Castet V, Ahmed-Arab M, Dross C, Dupont M, Cattani D, Smaoui N, Dode C, Pecheux C, Nedelee B, Medaxian J, Rozenbaum M, Rosner I, Delpech M, Gratenau G, Demaille J, Weissenbach J, Touitou I. Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 1998;7: 1317-1325.

26 <http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers>

27 Booth DR, Gillmore JD, Booth SE, Pepys MB, Hawkins PN Pyrin/marenostrin mutations in Familial Mediterranean Fever. *Q J Med* 1998;91: 603–606

-
- 28 V. P. Papadopoulos, S. Giaglis I. Mitroulis and K. Ritis¹ The Population Genetics of Familial Mediterranean Fever: *Annals of Human Genetics* 2008;72: 1469-1809
- 29 Kone-Paut I, Dubuc M, Sportouch J, et al. Phenotype-genotype correlation in 91 patients with Familial Mediterranean Fever reveals a high frequency of cutaneomucous features. *Rheumatol* 2000;39: 1275-1279.
- 30 Medlej-Hashim M, Delague V, Choueri E, et al. Amyloidosis in Familial Mediterranean Fever patients: correlation with MEFV genotype and SAAI and MICA polymorphisms effects. *BMC Med Genet* 2004;5: 1-6.
- 31 Tekin M, Yalçınkaya F, Çakar N, et al. MEFV mutations in multiplex families with familial Mediterranean fever: is a particular genotype necessary for amyloidosis? *Clin Genet* 2000;57: 430-434.
- 32 Doğanavşargil E, Keser G. Ailesel Akdeniz Ateşi. *Klinik Romatoloji, İstanbul, Deniz Matbaası, Ege Romatoloji* 1999;467-474
- 33 Cattani D, Delpech M. Fievre mediterraneenne familiale (maladie periodique): *Hepato-Gastro* 1996;3: 369-76.
- 34 Eisenberg S, Aksentijevich I, Deng Z, Kastner D.L. and Matzner J. Diagnosis of Familial Mediterranean Fever by a Molecular Genetics Method. *Ann Int Med* 1998;129:243-251.
- 35 Kastner DL. Hereditary periodic fever syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;6: 74-81.
- 36 Centola M, Wood G, Frucht DM, et al. The gene for Familial Mediterranean Fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000;95: 3223-31.

37 Tidow N, Chen X, Muller C, 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: 1451-5.

38 SK Ayeshe, Y Azar, BM Babior and Y Matzner *Blood* 1993;81: 1424-1427.

39 Eisenberg S. , Urieli-Shoval, S., Azar, Y. et al: C5a inhibitor and Pyrin/Marenostrin: Possible relationship. *Familial Mediterranean Fever. The official book of 1st International Conference on FMF* 1997; 275-277,

40 Matzner Y, Abedat S, Shapiro E, et al. Expression of the Familial Mediterranean Fever gene and activity of the C5a inhibitor in human fibroblast cultures. *Blood* 2000;96: 727-31.

41 Matzner Y, Partridge RE, Levy M, Babior BM. Diminished activity of chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with FamilialMediterranean Fever. *Blood* 1984;63: 629-33.

42 Barakat MH, Malhas LN, Gumaa KK. Catecholamine metabolism in recurrent hereditary polyserositis. Pathogenesis of acute inflammation: The retention leakage hypothesis. *Biomed Pharmacother* 1989; 43: 763-69.

43 Musabak U, Sengul A, Oktenli C, et al. Does immune activation continue during an attack-free period in Familial Mediterranean Fever. *Clin Exp Immunol* 2004;138:526-533

44 Chae JJ, Wood G, Masters SL, et al. The B30.2 domain of pyrin, FamilialMediterranean Fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 β production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9982-7.

45 Fietta P. Autoinflammatory diseases: The hereditary periodic fever syndromes. *Acta Biomed* 2004;75: 92-9.

46 Shohat M, Korenberg JR, Schwabe AD, Rotter JI. Hypothesis: Familial Mediterranean fever - a genetic disorder of the lipocortin family? *Am J Med Genet* 1989;34: 1637.

47 Hayashi A, Suzuki T, Shimizi A, Yammamara Y. Periodic fever suppressed by reserpine. *Lancet* 1976;1: 592-9.

48 Barakat MH, El-Khawad AO, Gumaa KA, El-Sobki NI, Fenech FF. Metaraminol provocative test: A specific diagnostic test for Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1984;24: 656-62.

49 Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsuyama T, Higuchi T, Sagara J. A novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 1999;274:33835–33838.

50 Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, Kastner DL. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* 2003;11: 591–604

51 Masumoto J, Dowds TA, Schaner P, Chen FF, Ogura Y, Li M, Zhu L, Katsuyama T, Sagara J, Taniguchi S, Gumucio DL, Nunez G, Inohara N. ASC is an activating adaptor for NF- κ B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:69-73

52 Stjernberg-Salmela S, Ranki A, Karenko L, Pettersson T. The genetic background of tumour necrosis factor receptor- associated periodic syndrome and other systemic autoinflammatory disorders. *Scand J Rheumatol* 2004;33: 133-9.

53 Demitürk L, Ozel AM, Cekem K, et al. Co-existence of *Helicobacter pylori* infection in patients with Familial Mediterranean Fever (FMF) and the effect of *Helicobacter pylori* on the frequency and severity of FMF attacks. *Dig Liver Dis* 2005;37: 153-8.

-
- 54 F. Yalçinkaya, E. Ince, et al. Antistreptococcal Response is Exaggerated in Children with Familial Mediterranean Fever. *Clin Rheumatol* 2002; 21: 378–381.
- 55 Guzide Aksu, et al. Hypercoagulability: interaction between inflammation and coagulation in familial Mediterranean fever. *Clin Rheumatol* 2007;26: 366–370
- 56 Ruiz N, Wang B, Pentland A, Caparon M. Streptolysin O and adherence synergistically modulate proinflammatory responses of keratinocytes to group A streptococci. *Mol Microbiol* 1998;2: 337–346
- 57 Fukumori T, Ohta H, Okubo A, Hino M, Ohta K, Yamane T, Tatsumi N. New compact-type latex photometric immunoassay system for hemoglobin and three acute inflammation markers: neutrophil count, C-reactive protein, and anti-streptolysin O. *J Clin Lab Anal* 2002;16: 95–102
- 58 Stassen M, Muller C, Richter C, Neudorfl C, Hultner L, Bhakdi S, Walev I, Schmitt E. The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C-dependent pathways. *Infect Immun* 2003;71: 6171–6177
- 59 Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *N J Med* 1967; 43: 227-53.
- 60 Akarsu N, Saatçi U, Ozen S, Bakkaloglu A, Beşbaş N, Sarfarazi M. Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. *J. Med. Genet.* 1997;34: 7573-578.
- 61 Amyloidosis FMF and MEFV gene. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest* 2000; 7: 289-293
- 62 Michaeli D, Pras M, Rosen N. Intestinal strangulation complicating familial Mediterranean fever (FMF). *B Med J* 1966;2: 30-2.
- 63 Ismachovich B, Zemer D, Revach M, Serr DM, Sonar E The causes of sterility in females with familial Mediterranean fever. *Sterility and Fertility* 1973;24: 844-7.

-
- 64 Reissmann P, Durst AL, Rivkind A, Szold A, Ben-Chetrit E, Elective laparoscopic appendectomy in patients with Familial Mediterranean fever. *World J Surg* 1994; 18: 139-41.
- 65 Desnick RJ. The porphyrias. In: In Isselbacher KJ, ed. *Harrison's principle of internal medicine* 1994;13: 2073-79.
- 66 Zimand S, Tauber T, Hegesch T, Aladjem M: Familial Mediterranean fever presenting with massive cardiac tamponade. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: 67-69.
- 67 Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, et al. MEFV-gene analysis in Armenian patients with familial mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 1999;65: 88-97.
- 68 Kees S, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Pras M, Livneh A. Pericarditis as a rare manifestation of familial Mediterranean fever (FMF).In: Sohar E, Gafni J, Pras M, eds. *Familial Mediterranean Fever*. Tel Aviv: Freund Publishing House 1997;90:129-131.
- 69 Dabestani A, Noble LM, Child JS, et al: Pericardial disease in familial Mediterranean fever. An echocardiographic study. *Chest* 1982; 81: 592-595.
- 70 Claudia Fonnesu, Claudia Cerquaglia et al: Familial Mediterranean Fever: A review for clinical management. *Joint Bone Spine* 2009;76: 227-233
- 71 Majeed HA, Barakat M. Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in children: analysis of 88 cases. *Eur J Pediatr* 1989;148:636-41.
- 72 Pras ER, Livneh A, Balow JE Jr, Pras EI, et al. Clinical differences between North African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet*. 1998;75: 216-219.
- 73 Gedalia A, Adar A, Gorodischer R. Familial Mediterranean fever in children. *J Rhumatol* 1992;35: 1-9.

74Sneh E, Pras M, Michaeli D, Sham N, Gafni J. Protracted arthritis in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Rehabil* 1977;16: 102-6.

75 Salai M, Zemer D, Segal E, Corat A, Heyman Z, Davidson B, Langevitz P, Livneh A, Chronic massive knee effusion in familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 27: 169-72.

76 Younes M, Kahn MF, Meyer O. Hip involvement in patients with familial Mediterranean fever. A review of ten cases. *Joint Bone Spine* 2002;69: 560-5

77 Langewitz P, Livneh A, Zemer D, Shemer J, Pras M, Seronegative spondyloarthropathy in familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 1997;27: 67-72.

78 Langevitz P, Zemer D, Livneh A, Shemer J, Pras M. Protracted febrile myalgia in patients with familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1994;21: 1708-9.

79 Ertekin, V, Selimoglu, MA, Alp, H, Yilmaz, N. Familial Mediterranean fever protracted febrile myalgia in children: report of two cases. *Rheumatol Int* 2005; 25: 398.

80 Majeed HA, Rawashdeh M, El Shanti H, Qubain H, Khuri-Bulos, Shahin M. Familial Mediterranean fever in children: the expanded profile. *Q J Med* 1999;92: 309-318.

81 Majeed HA, Quabazard Z, Hijazi Z, Farwana S, Harshani F. The cutaneous manifestations in children with familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis). A six year study. *Q J Med* 1990;75: 607-616.

82 Kastner D.L. Intermittent and periodic arthritic syndromes. InKoopman, W.J. (ed.), *Arthritis and Allied Conditions*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD 1997;1: 1279–1306.

83 Ozen S, Ben-Chetrit, E, Bakkaloglu, A, et al. Polyarteritis nodosa in patients with Familial Mediterranean Fever (FMF): Arthritis Rheum 2001; 30: 281.

84 Flatau E, Kohn D, Schiller D, Lurie M, Levy E. Schonlein-Henoch syndrome in patients with familial Mediterranean fever. Arthritis Rheum 1982;25: 42–47

85 Glikson M, Galun E, Schlesinger M, Cohen D, Haskell L, Rubinow A, Eliakim M. Polyarteritis nodosa and familial Mediterranean fever: a report of 2 cases and review of the literature. J Rheumatol 1989;16: 536–539

86 Schwartz T, Langevitz P, Zemer D, Gazit E, Pras M, Livneh A. Behcet's disease in familial Mediterranean fever: characterization of the association between the two diseases. Semin Arthritis Rheum 2000;29: 286–295

87 Friman C, Pettersson T. Amyloidosis. Curr Opin Rheumatol 1996;8: 62-71

88 Rogers DB, Shohat M, Petersen CM, Bickal J, Congleton J, Schwabe AD, Rotter JI. Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. Am J Med Genet 1989;34: 168-172

89 Bakkaloğlu A. Familial Mediterranean Fever; Pediatric Nephrol 2003;18: 853-859.

90 Benson MB, Cohen AS. Serum amyloid A protein in amyloidosis, rheumatic and neoplastic diseases. Arthritis Rheum 1979;22: 36-42.

91 Heller H, Sohar E, Gafni J, Heller J. Amyloidosis in familial Mediterranean fever. An independent genetically determined character. Arch Intern Med 1961;107:539-55.

92 Erken E., Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2006, 2 :4-11.

93 Goldfinger S.E. Colchicine for Familial Mediterranean Fever. (Letter) New Eng J Med 1972; 287:1302.

94 Ben-Chetrit, E, Levy, M. Familial Mediterranean Fever. Lancet 1998; 351:659.

-
- 95 Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabili S, Gafni J. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Eng J Med* 1986;314:1001-5.
- 96 Shiora M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A, Sagara J. ASC, which composed of a PYD and CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293:1314-1318.
- 97 Eliakim M, Levy M, Ehrenfeld M. Laboratory examinations. In: *Recurrent Polyserositis (familial Mediterranean fever, periodic disease)*. Amsterdam: Elsevier North Hollan.1981: 37-95.
- 98 Celkan T, Çelik M, Kasapçopur Ö, et al. The anemia of familial Mediterranean fever disease. *Ped Hematol Oncol* 2005;22: 657-665.
- 99 Erken E, Gunesacar R, Ozbek S, Konca K. Serum soluble interleukin 2 receptor levels in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*, 1996;55: 852- 855.
- 100 Özel A, Demirtürk L., Yazgan Y., Familial Mediterranean Fever. A review of the disease and clinical and laboratory findings in 105 patients. *Dig Liver Dis* 2000;32: 504-9.
- 101 Matzner Y, Brezizinski A. C5a-inhibitor deficiency in peritoneal fluids from patients with Familial Mediterranean Fever *N Engl J Med* 1984;311:287-290.
- 102 French FMF Consortium. Localization of the familial Mediterranean fever (FMF) gene to a 250-kb interval in non-Ashkenazi Jewish founder haplotypes: *Am J Hum Genet* 1996;59: 603-12.
- 103 M. Shohat T, Brenner-Ullman A, Shohat VI. Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populations in Israel. *Am J Med Genet* 1995;55: 311-314.
- 104 Livneh A, Langevitz P, Zemer D. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 1997;40: 1879-85.

105 Langevitz P, Livneh A, Zemer, D, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1879.

106 Hasan A. Majeed, Hatem El-Shanti, Mohammed S. Al-Khateeb, and Z. Abu Rabaiha. Genotype/Phenotype Correlations in Arab Patients With Familial Mediterranean Fever. *Semin Arthritis Rheum* 2002;31: 371-376.

107 Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001;345:1748-1757.

108Touitou I, Sarkisian T, Medlej-Hashim M, et al. Country as the primary risk factor for renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1706–1712.

109 Özkan E, Okur O, Ekmekci A, Ozcan R, Tag T. A new approach to the treatment of periodic fever. *Med Bull Istanbul* 1972;4 4-49.

110 Kershenovich D, Varga F, Garcia Tao G, Tamayo RP, Gent M, Rojkind M. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. *N Engl. J Med* 1988;318:1709-13.

111Schattner A Colchicine-expanding horizons. *Postgrad Med J* 1991;67: 223-226.

112 Özen S, Uçkan D, Baskın E, Okur H, Beşbaş N, Saatçi Ü, Bakkaloğlu A. Apoptosis in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18: 277.

113 Livneh A, Zemer D, Langevitz P, Laor A, Sohar E, Pras M. Colchicine treatment of AA amyloidosis of familialMediterranean fever. An analysis of factors affecting outcome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1804–1811

114 Calguneri M, Apras S, Ozbalkan Z, et al. The efficacy of Interferon-alpha in a patient with resistant Familial Mediterranean Fever complicated by polyarteritis nodosa. *Intern Med* 2004;43: 612-4.

115 Ureten K, Calguneri M, Onat AM, et al. Interferon-alpha in a protracted arthritis of Familial Mediterranean Fever: a robust alternative for synovectomy. *Ann Rheum Dis* 2004;63: 1527.

116 Tunca M, Akar S, Soy Turk M, et al. The effect of Interferon-alpha administration on acute attacks of Familial Mediterranean Fever: a double blind, placebo-controlled trial. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22: 37-40.

117 Seyahi E, Ozdogan H, Celik S, et al. Treatment options in colchicine resistant Familial Mediterranean fever patients: thalidomide and etanercept as adjunctive agents. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24: 99-103.

118 Himanshu Kumar, Taro Kawai, Shizuo Akira Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;388: 621–625.

119 C.A. Janeway Jr., R. Medzhitov, Innate immune recognition, *Annu. Rev. Immunol* 2002;20: 197–216.

120 S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity, *Cell* 2006;124: 783–801.

121 R. Medzhitov, Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature* 2007;449: 819–826.

122 B.A. Beutler, TLRs and innate immunity, *Blood* 2009;113: 1399–1407.

123 Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 103-10.

124 Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal–ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985;42: 791–8.

-
- 125 Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal–ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985;42: 779–89.
- 126 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86: 973–83.
- 127 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388: 394–397.
- 128 Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 38105-8.
- 129 Modlin RL. Mammalian toll-like receptors. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;88: 543-7.
- 130 Tuba Turul, Fügen Ersoy. Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll-like reseptörler (TLR). *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 114-118
- 131 Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005;54: 1182-93.
- 132 Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117: 979-87.
- 133 Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007;13: 552-9.
- 134 Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leucocytes: selective expression of TLR-3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998-6004.

135 Tapping RI, Akashi S, Miyake K, et al. Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2 is a signalling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol* 2000; 165:5780-7.

136 Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002; 30: 1-11.

137 Utahaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good R, Haraguchi S. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 253-65.

138 Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 588- 93.

139 Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766-71.

140 Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 2007;12: 80-7.

141 Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002;168:554-61.

142 Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282: 2085-8.

143Metzhitov R, Janeway C Jr. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000;343: 338-44.

144Bhattacharjee RN, Akira S. Toll-Like Receptor Signaling: Emerging opportunities in human diseases and medicine. *Curr Immunol Rev* 2005;1: 81-90.

145 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H et al. Role of adapter TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301: 640-3.

146 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4: 1144-50.

147 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4: 499-511.

148 Cook D.N. , D.S. Pisetsky, and D.A. Schwartz. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology* 2004;5: 975–979.

149 Ozen S. , A. Berdeli, B. Türel, et al. Arg753Gln TLR-2 polymorphism in familial Mediterranean fever: Linking the environment to the phenotype in a monogenic inflammatory disease. *The Journal of Rheumatology* 2006;33: 2498–2500.

150 Alper Soylu, Halil Ateş et Al. TLR Polymorphisms in FMF: Association of TLR-2 (Arg753Gln) and TLR-4 (Asp299Gly, Thre399Ile) Polymorphisms and Myeloid Cell TLR-2 and TLR-4 Expression with the Development of Secondary Amyloidosis in FMF. *Inflammation* 2010;10: 9245-9

151 Jennifer A. Rettew, Yvette M. Hueet Al. Estrogens Augment Cell Surface TLR4 Ekspression on Murine Macrophages and Regulate Sepsis Susceptibility In Vivo. *Endocrinology*, August 2009, 150: 3877-3884.