

 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (FAMILIAL MEDITERRANEAN
FEVER-FMF) HASTALARINDA İNOS GEN POLİMORFİZMİNİN
ve NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Havva KOÇAK

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ**

2011 – ISPARTA

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (FAMILIAL MEDITERRANEAN
FEVER-FMF) HASTALARINDA İNOS GEN
POLİMORFİZMİNİN ve NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Havva KOÇAK

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ**

**Bu tez, Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
2297-TU-10 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

2011 – ISPARTA



TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden basılmasına kadar geçen sürede yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ'ye ve uzmanlık eğitimim boyunca her konuda bana yardımcı olan hocalarım Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN'e, Prof. Dr. Hüseyin VURAL'a, Prof. Dr. İrfan ALTUNTAŞ'a, Doç. Dr. Mehmet AKDOĞAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ'a,

Asistanlığım boyunca laboratuvar çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve teknisyen arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca bana her zaman destek olan sevgili aileme ve çalışmamın en başından itibaren her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Ahmet KOÇAK'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
TABLolar, ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE RESİMLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi.....	4
2.1.1. Tanım.....	4
2.1.2. Tarihçe.....	4
2.1.3. Epidemiyoloji.....	6
2.1.4. AAA Patogenezi.....	6
2.1.5. AAA Hastalığında Klinik	11
2.1.6. Laboratuvar.....	15
2.1.7. Tanı.....	15
2.1.8. Tedavi.....	18
2.2. Nitrik Oksit (NO).....	19
2.2.1. Nitrik Oksidin Biyosentezi ve NOS'un İzofomları.....	19
2.3. iNOS'un Moleküler Biyolojisi.....	21

3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi	23
3.2. Hastaların Gruplandırılması	23
3.3. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanışı	24
3.4. DNA İzolasyonu.....	24
3.5. MEFV Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi.....	25
3.5.1. Çoklu-PCR Amplifikasyonu.....	25
3.5.2. Agaroz Jel Elektforeziyle PCR kontrolü.....	27
3.5.3. Agaroz Jelin Hazırlanması.	27
3.5.4. Örnek Yükleme Tamponu (Loading Dye).....	28
3.5.5. Revers İn situ Hibridizasyon Yöntemi.....	28
3.5.6. Sonuçların Okunması.	31
3.6. iNOS Gen Polimorfizmi.....	33
3.7. Plazma Nitrik Oksit (NO) Seviyesinin Ölçülmesi.	35
3.7.1. Deneyin İlkesi.....	35
3.7.2. Nitrat Standart Eğrisinin Hazırlanması	35
3.7.3. Plazma Örneklerinin Hazırlanması	36
3.7.4. Ölçüm İşlemi.....	36
3.7.5. NO Değerinin Hesaplanması.	37
3.7.6. Standart Eğrilerin İşaretlenmesi.....	37
3.8. İstatistik Analiz.	38
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. ÖZET	50
7. SUMMARY	52
KAYNAKLAR	54

SIMGELER ve KISALTMALAR TABLOSU

AAA	Ailesel Akdeniz Ateşi
MEFV	MEditerranean FeVer
NO	Nitrik oksit
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
PyD	Pirin Bölgesi
ASC	Apoptosis Speck Complex
FCU	Fenilketonüri
NOMID	Yenidoğan sistemik yangısal
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid
BH4	Tetrahidrobiopterin
RTA	Rapid termal annealing
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
HETE	Hidroksikozatetraenoat
NF-Kappa	Nükleer Faktör-Kappa
MWS	Muckle-Wells Sendromu

TABLolar, ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

TABLolar

Sayfa No

Tablo 1: Tel-Hashomer Tanı Ölçütleri .	16
Tablo 2: Avi-Livneh Tanı Ölçütleri	17
Tablo 3: Bir hasta için FMF strip assay içeriği	26
Tablo 4: PCR döngü sürecine ait işleyişı gösteren zaman çizelgesi	26
Tablo 5: Revers hibridizasyonda, wild ve mutant band tipleri	33
Tablo 6: AAA grubundaki olguların MEFV ve İNOS genotip sonuçları	41
Tablo 7: AAA ile kontrol grubunun İNOS genotipinin karşılaştırılması	44
Tablo 8: AAA grubunda, İNOS homozigot ve heterozigot dağılımı	44

ŞEKİLLER

Şekil 1: PyD bölgesi bulunan proteinler	9
Şekil 2: Nitrik oksidin L-arjinin amino asidinden sentezlenmesi	20
Şekil 3: FMF strip assay	32
Şekil 4: Wild ve mutant bandlar	33

RESİMLER

Resim 1: Termal cycler cihazı	27
Resim 2: Agaroz jelde DNA örnekleri	29
Resim 3: Enzim kesimi sonrası ürünlerin jel elektroforez ortamındaki görüntü	34
Resim 4: Normal, heterozigot, bileşik heterozigot ve homozigot mutasyonlar	40

1. GİRİŞ ve AMAÇ

AA) periton, plevra ve sinoviyada ortalama olarak 12 ile 96 saat arası süren yangısal reaksiyon atakları, karın ve eklem ağrısı, halsizlik ve ateş yükselmesi belirtileriyle kendini gösteren bir rahatsızlıktır. Kliniğinde peritonit, plörit, artrit ve deri lezyonları da görülmektedir.

Hastalığın etyolojisi ve kökeni, tam olarak bilinmemektedir (1). Dünya üzerindeki görülme sıklığı bakımından hemen hemen bütün vakalar Akdeniz havzasındaki ülkelerde ve Ortadoğu'da görülmekte ve genetik yönden otozomal çekinik geçiş göstermektedir (2). Hastalarda ataksız dönemde herhangi bir belirti görülmemektedir fakat, bu dönemde de yangısal reaksiyonun devam ettiği düşünülmektedir (3).

AAA hastalığının bir diğer önemli belirtisiyse, sistemik amiloidoz birikimidir. Dokularda biriken amiloid, özellikle böbreklerde işlev bozukluğuna ve böbrek yetmezliğine yol açabilmektedir. Bu hastalığın tedavisinde, ilk kez 1974 yılında kolşisin kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan kontrollü denemelerde, yeterli dozda kolşisin kullanımının atakların şiddetini ve sıklığını azalttığı görülmüştür (4-6). Daha sonraları, kolşisinin amiloidoz gelişimini önlemede de faydalı olduğu bulunmuştur (7).

AAA hastalığının temel patogenezinde, 16. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan MEFV geninde mutasyon vardır (8,9). Pirin veya mareonostin olarak adlandırılan ve MEFV geni tarafından kodlanan bir proteinin, yangısal reaksiyonlara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. MEFV geninde meydana gelebilecek bir mutasyonun, pirin proteini oluşumunda anormalliklere yol açabileceği ve bunun da, AAA'da görülen klinik tabloyla sonuçlanabileceği düşünülmektedir (10,11).

Uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), yangısal reaksiyonda fazla miktarda nitrik oksit (NO) üretiminden sorumlu olan bir enzimdir. iNOS makrofajlarda, nötrofillerde, damar düz kas ve endotel hücrelerinde, hepatositlerde, mezanjiyal hücrelerde, kıkırdak dokusu hücrelerinde ve fibroblastlarda yaygın şekilde bulunan bir enzimdir (12).

u, diğ er iki NOS izoformu olan eNOS ve nNOS'un aksine
ilmektedir (13). Sitokinlerin, C5'in, histaminin, lökotrien
12-HETE'nin tekrarlayan ateş ataklarındaki yeri iyi bir
şekilde belgelenmesine rağmen, bunların FMF'nin patogenezindeki önemi tam açık
değildir (14-19).

Nitrik oksit'in (NO) lökositlerin dokulara geçişinde, lökositlerin endotele
adezyonunda, lenfosit işlevinin düzenlenmesinde, sitokin salınımında, kapiller
geçirgenliğinde, eritem ve ödem oluşumunda, mikrodamarların genişlemesinde, ağrı
modülasyonunda ve ağrıya karşı hassasiyetin gelişiminde anahtar rol oynayan önemli bir
yangısal medyatör olduğ u bilinmektedir (20-23).

Enfeksiyon veya travmanın, kanda NO'nun oksidasyon ürünlerinin birikimine yol
açtığı gösterilmiştir (24-26). Dolayısıyla, sepsisli hastalarda plazma nitrik oksit
seviyeleri artarken, aynı zamanda artritli ve kolitli hastaların sinoviyal sıvılarında ve
serumlarında da artan NO seviyeleri rapor edilmiştir (25, 27-29). Gliseril trinitrat gibi
NO üretiminin öncüllerinin insanlardaki ağrı eş iğini düşürdüğü gösterilmiştir ve
uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) inhibitörleriyle uygulanan tedavi, yangı derecesini
veya eşlik eden artriti azaltmaktadır (30,31).

Bu çalışmamızda, yangısal reaksiyonlardaki rolü halen geniş çaplı araştırma
konusu olan NO'nun ve vücuttaki çoğu hücre türünde NO sentezinden sorumlu olan
iNOS enziminin ifade edilmesini yöneten gen bölgeleriyle AAA gibi ciddi yangısal ve
sistemik sonuçları olan bir hastalık arasındaki bağlantıların ve bu rahatsızlıkta iNOS gen
bölgelerinde herhangi bir polimorfizmin olup olmadığının incelenmesi ve söz konusu
genlerdeki muhtemel değ iş ikliklerin biyokimyasal parametrelere olan etkilerinin
araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.1. Tanım

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA), çoğu kez ateş ile birlikte olan periton, sinovyum, plevra ve nadiren de perikardın tutulduğu, 12-96 saat arasında süren ve spontan olarak iyileşen akut yangı atakları ile ortaya çıkan, otozomal çekinik geçişli ve etnik kökenli bir hastalıktır (32-34). Ataklar değişen aralıklarla nükseder ve hastalık ömür boyu sürer. Ataklar arası dönemde hastaların genel durumları oldukça normaldir. Bununla birlikte, çocuklarda baş ağrısı ve yorgunluk şikayetleri gözlenmiştir. Ataklar her hafta tekrarlayabileceği gibi bazen haftalarca hatta aylarca tekrarlamayabilir.

Hastalığın en ağır komplikasyonu AA tipi amiloidozdur ve genelde bu gruba giren hastalar daha az belirti verir. Amiloidoz, AAA kolşisin ile tedavi edilmediği takdirde bazı hastalarda böbrek yetmezliği ve diğer organ hasarı ile sonuçlanabilecek kadar ilerleyebilir. Özellikle Doğu Akdeniz’de yaşayan halklardan Sefarad Yahudilerinde, Türklerde, Ermenilerde ve Akdeniz çevresinde yaşayan Araplarda görülen Ailevi Akdeniz Ateşi, kalıtsal periyodik ateş grubu hastalıkları için bir prototiptir. Periyodik hastalık, ailevi paroksizmal poliserozit, herediter reküran poliserozit gibi isimlerle de anılmaktadır.

2.1.2. Tarihçe

Hastalık ilk kez 1908 yılında Janeway ve Mosenthal tarafından 16 yaşında Yahudi bir kızda tekrarlayan ateş ve karın ağrısı atakları “değişik bir paroksizmal sendrom” olarak tanımlanmıştır. Bundan sonra, hastalığın ilk ayrıntılı tanımlanması 1945’te Siegal tarafından “ benign paroksizmal peritonit “ adı ile yapılmıştır (35). 1946 yılında ülkemizde ilk kez A.Marmaralı’nın “ garip bir karın sendromu“ adı altında tanıttığı bu hastalığa, 1948 yılında Riemann “periyodik hastalık” demiştir (36). 1951 yılında Mammou ve Cattan hastalığın ailesel geçişini ve amiloidozla olan ilişkisini göstermişlerdir (37).

lanması 1955 ve 1958 yılları arasında İsrail’li araştırmacı (38). Siegal, 1965 yılında ‘‘Ailevi Paroksizmal Poliserozit’’ ismini kullanmıştır. Sonra ve u arkadaşlarının önerdiği ‘‘Familial Mediterranean Fever’’ (Ailevi Akdeniz Ateşi) ismi 1967 yılından beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Hastalıkla ilgili daha sonraki en önemli gelişmelerse, 1972’de kolęisinin tedaviye girmesi, 1992’de hastalıkla ilgili genin yerinin tespit edilmesi ve 1997’de genin klonlanmasıdır (9,39).

Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünde AAA geninin gen lokusunun 16. kromozomun kısa kolunda 16p13.3 noktasında olduğu bulunmuştur (40). Ardından İsrail, Amerika Birleşik Devletleri ve Avustralya’dan katılan çalışma grupları Uluslararası AAA Konsorsiyumu’nu kurmuşlardır. Aynı dönemde, İsraili araştırmacılar ve birkaç Fransız laboratuvarı birlikte çalışarak ikinci bir konsorsiyum olan Fransız AAA Konsorsiyumu’nu kurmuşlardır. Her iki konsorsiyum da, birbirinden bağımsız olarak çalışmalarını sürdürmüştür. Her iki konsorsiyum da, 1997 yılına gelindiğinde eş zamanlı olarak AAA genini tespit etmişlerdir.

AAA hastalığının geni, hastalığın Akdeniz bölgesindeki topluluklarda görölmesi ve en öne çıkan belirtinin ateş olmasına ithafen, Akdeniz ateşi anlamına gelen MEFV (MEditerranean FeVer / MIM 249100) olarak adlandırılmıştır. Günümüzde Yunanistan, İtalya gibi güney doğu Avrupa ülkelerinde, Almanya, Polonya, Avustralya gibi orta Avrupa ülkelerinde hatta Uzakdoğu ülkelerinden Japonya’da AAA hastalarının olduğu bildirilmiştir (39,41-45).

2.1.3. Epidemiyoloji

Hastalık Türkiye’de ülke genelinde yaygın olmakla birlikte, ilk veriler AAA hastalarının çoğunun Orta Anadolu kökenli olduğunu düşündürse de, son alışmalar Doğu ve Kuzey Anadolu kökenli hasta yoğunluğunun daha fazla olduğunu göstermiştir (46). Türkiye’de hastalık prevalansı yaklaşık olarak 1:1000 iken, bu sayı İsrail’de 1:500’e kadar çıkabilmektedir. (47-50). Taşıyıcılık frekansı ise , topluluklar arasında farklılık göstermektedir. Türklerde 1:5, Kuzey Afrika Yahudilerinde 1:6-8, Irak Yahudilerinde ise 1:13.3 ve İsrail’de 1:11 ve Ermenilerde taşıyıcılık frekansı 1:7, Araplarda 1:4.3 olarak

ellikle bu etnik gruplarda yaygın olarak rastlanması, AAA arındaki dağılıma bakarak yaklaşık 2000-2500 yıl önce Orta Doğu'da ortaya çıkıp Anadolu, Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Ermenistan'ı içine alan Ön Asya bölgelerine yayıldığına göstergesi olarak kabul edilmiştir (39).

2.1.4. AAA Patogenezi

Ailevi Akdeniz Ateşi ifadesi, hastalığın klasik üç klinik özelliğini de içine almaktadır: Hastalığın otozomal çekinik kalıtım şeklinin olması, özellikle Akdeniz havzasında yaşayan toplulukları etkilemesi ve tekrarlayan ateş atakları ile seyretmesidir. İnfantil dönemde ortaya çıkan bazı AAA vakaları olsa da, hastaların çoğu ilk ataklarını çocukluk veya adolesan döneminde, % 80'inden fazlası da 20 yaşından önce geçirir (9,32,33,53).

Erkek / kadın oranının 1.5-2.0 / 1.0 olarak rapor edilmiş olması, mutasyonun kadınlara geçişi azalttığı ihtimalini ve kadın hastaların çoğunda atakların sıklıkla menstrüel döngüyle birlikte olması, kadın cinsiyet hormonlarının hastalık üzerine etkisi olabileceği ihtimalini akla getirmektedir. Bunun yanı sıra, çoğu kadın hastada atakların gebelik sırasında kaybolup, doğumdan sonra tekrar ortaya çıktığı ifade edilmektedir. Hastalığın etyopatogenezi, bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Bu noktada enfeksiyon, allerji ve bazı psikolojik bozukluklar suçlanmışsa da, bir ipucu bulunamamıştır.

Hastalığın etyopatogenezi için öne sürülen görüşler, iki ana grupta toplanmaktadır. Birinci görüşe göre, AAA bir katekolamin metabolizma bozukluğudur ve aşırı miktarda endojen katekolamin salınımı, nöbetlere yol açmaktadır. Fakat, bu görüş artık güncel değildir ve desteklenmemektedir. Etyopatogenezi daha güncel olarak açıklayan diğer görüş ise, organizmadaki yangı cevabında meydana gelen bir bozukluğa dayanmaktadır. Buradaki ilk bozukluk, nötrofillerdeki lizozom işlevindeki eksikliğe bağlı olarak ortaya çıkan yalancı yangısal uyarılardır. Buna yol açan ise, AAA hastalarının serumlarında ve seröz sıvılarında C5a engelleyici seviyelerindeki eksikliklerdir.

gerçekleştirilen epidemiyolojik ve klinik çalışmalar olduğunu yıllardan beri düşündürmekte olmasına rağmen, karınımı kesim toru ancak 1992 yılında AAA geninin 16. kromozomun kısa kolunda olduğunun bulunmasıyla ortaya konmuştur. Daha sonraları, bu gen klonlanmış ve 1997 yılında MEFV adı verilmiştir. MEFV genine pirin / marenostin denmiş ve AAA'nın bu gendeki mutasyonla oluştuğu tespit edilmiştir.

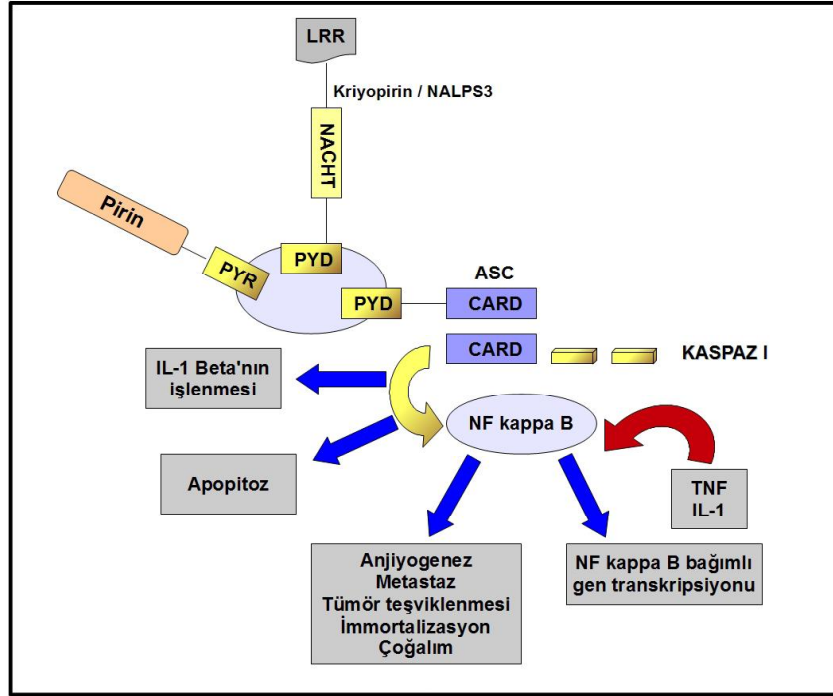
Pirin / marenostin geni 10 kb uzunluğunda olup, 10 eksondan oluşmuştur ve 781 aminoasitli pirin proteinini kodlamaktadır (54). Bu genle ilgili bulunan çoğu mutasyonların 10. eksonda olduğu ortaya çıkmıştır (55). Pirinin görevi tam olarak bilinmemekle birlikte, yangısal olayların cevabının kontrolünde ve hafifletilmesinde rol oynadığını gösteren bazı çalışmalar vardır (56,57).

Daha yakın zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar, pirin / marenostin proteininin amino terminal ucuyla (1.-300. amino asitler), hücre sinyal iletim yolunda görevli bir grup protein arasında benzerlik olduğunu göstermiştir. Pirin / marenostin PyD (pyrin bölge) ailesinin bir üyesidir ve NF-kappa'nın da içerisinde olduğu B-hücre sinyal iletiminde rol oynar. NF-kappa ise, önemli bir transkripsiyon unsurudur ve yangıya öncülük eden işlevleri yönlendirir (58).

PyD bölgesi 95 amino asitten oluşur ve ölüm bölgelerini (DD: death domain), ölüm etkili bölgeleri (DED: death effector domain) ve kaspaz bölgelerini (CARD: caspase recruitment domain) içine alan ölüm bölgesi üst ailesinin bir üyesidir (Şekil 1). Bu ailenin üyeleri yangı proteinlerinde, apoptoziste görev alan bazı proteinlerde ve protein-protein etkileşiminde rol almaktadır (59).

Bu domain ailesinin üyesi olan proteinler, kaspaz çalıştırıcı proteinlerle birlikte hareket ederek apoptoz öncülü bir protein olan ASC'nin (apoptosis speck complex) oluşumuna katılırlar. Yapılan araştırmalar, yangı olan dokularda nötrofillerdeki ASC ifadesinin arttığını göstermektedir. Ayrıca, yangıya öncülük eden düzenleyici nötrofillerde ASC ifadesinde artış olduğu in-vitro olarak gösterilmiştir (60).

ASC'nin nötrofillerin yol açtığı yangıyla ve nötrofil nü göstermektedir. Nötrofiller, normal şartlarda yangısal reaksiyon bölgesindeki görevlerini tamamladıktan sonra apoptoza uğrar fakat, buradaki apoptoz mekanizması tam olarak bilinmemektedir (61). Bir hipotezde, pirin / marenostirin proteininin yangısal aracı maddelerde aşağı yönde düzenlemeye ve nötrofillerde apoptoza yol açabileceği öne sürülmüştür (62,63).



Şekil 1: PyD bölgesi bulunan proteinler, apoptotik speck proteini (ASC) ile etkileşerek yangısal reaksiyonları düzenler. Pirin engelleyici olarak rol alırken, kriyopirinin ASC ile birleşmesi, kaspaz-1 yoluyla IL-1'i uyarır. Potansiyel mutasyonlar sonucu pirinde meydana gelen işlev kaybı, engelleyici etkiyi azaltarak otoenflamasyona yol açabilir. Alternatif olarak, MWS/FCU/NOMID hastalarında olduğu gibi kriyopirine yeni işlev kazandıran mutasyonlar bu yolağı etkinleştirebilir. ASC, apoptozda ve yangısal reaksiyon cevabının hem baskılanmasında ve hem de düzenlenmesinde rolü olan NF-kappa transkripsiyon unsurunun etkinleşmesinde görev alır [(IL-1,interlökin-1; LRR, lösin bakımından zengin tekrarlar, (leucine-rich repeats); TNF, tümör nekroz faktörü)].

a gelen herhangi bir mutasyon, pirin proteininin yangı ve sonuçta hastalığa ilişkin bulgular görülmektedir. Bu proteindeki mutasyonların varlığı, yangısal reaksiyon cevabındaki artışla kendini belli etmektedir. Bunun yanında, AAA hastalığının niçin seröz dokuları hedeflediği ve belirtilerinin neden tekrarlayan şekilde ortaya çıktığı soruları, bugün bile tam olarak cevaplanamamıştır (64).

Bugüne kadar AAA ile ilgili çok sayıda MEFV mutasyonları gösterilmiş olup, bunların içinde yer alan M694V mutasyonunda, bu mutasyon homozigot olmamasına rağmen amiloidozun daha sık olduğu bulunmuştur (65-69). MEFV geninin klonlanmasıyla ilgili en yaygın dört mutasyon, şu şekildedir:

1. Valin, metiyoninin yerine geçmiştir. (M694V)
2. Alanin, valinin yerine geçmiştir. (V726A)
3. İzolösin, metiyoninin yerine geçmiştir. (M680I)
4. İzolösin, metiyoninin yerine geçmiştir. (M694I)

Özellikle, M694V mutasyonunun homozigot olmasıyla hastalığın ağır seyretmesi ve bu tür mutasyona sahip kişilerde amiloidoz gelişiminin daha sık olması arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir (70-73). Bu mutasyon, özellikle Afrikalı Yahudilerde, Ermenilerde, Türklerde ve Araplarda sık olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra, M694V mutasyonunun AAA hastalığı olan Türk ailelerinde ilk sırayı aldığı ve amiloidozlu AAA hastalarının hepsinde, en az bir alelde M694V mutasyonunun olduğu belirtilmiştir (66,74). Fakat, daha sonra yapılan bazı çalışmalarda sadece M694V mutasyonunun değil, aynı zamanda diğer mutasyonların da amiloidoz gelişiminde etkili oldukları ortaya çıkarılmıştır.

Günümüzde, AAA hastalığının şiddetinde ve en ağır komplikasyonu olan amiloidoz gelişiminde MEFV gen mutasyonlarının yanı sıra diğer bazı düzenleyici genlerin ve henüz netlik kazanmayan çevresel unsurların rolü tartışılmaktadır (75,76).

kuşak atlar, ancak bazı topluluklarda, taşıyıcı frekansının in sık olduğu durumlarda, dikey kalıtım benzeri geçiş gözlenebilir. Parametrik dominant kalıtıma benzeyen bu sonuç, bazı araştırmacıların kalıtım kalıplarıyla ilgili çalışmalarda hastalığın otozomal dominant geçişli olduğunu ileri sürmelerine yol açmıştır (2).

2.1.5. AAA Hastalığında Klinik

AAA, çocukluk çağında başlayan bir hastalıktır. Klinik bulguların ortaya çıkışı, vakaların yüzde 90'ında yirmi yaşın, yüzde 63-68'indeyse beş yaşın altındadır. Klinik dışavurumların başlangıç yaşı en erken altı ay olarak bilinmektedir (77). Hastalık peritonit, sinovit veya plevra yangısı bulgularının eşlik ettiği tekrarlayıcı ateş atakları özelliği taşır. Deri, perikard, meninksler ve tunika vajinalis, daha az sıklıkta tutulur. Ataklar 6-96 saat arasında sürer ve ataklar arasında belirti görülmez.

Atakların ağırlığı ve sıklığı, hastalar yaşlandıkça azalır. AAA hastalarında atakları tetikleyen bazı faktörlerin olduğu belirtilse de, çoğu hastada atakların herhangi bir neden olmaksızın oluştuğu bilinmektedir. Ataklara öncülük ettiği bilinen bazı unsurlar arasında egzersiz, stres, ameliyatlar ve menstruasyon döngüleri sayılabilir (2).

AAA'nın belli başlı belirti ve bulguları arasında ateş (% 96), peritonit (% 91), plörezi (% 57), artrit/artralji (% 45), erizipel benzeri eritem (% 13) ve amiloidoz (% 2) vardır. Diğer bulgular arasında baş ağrısı, aseptik menenjit, perikardit, splenomegali, akut skrotum, ateşli miyalji, purpura ve proteinüri yer almaktadır (10). Türk AAA çalışma grubu, 2838 hastadaki klinik bulguları ateş (% 92,5), peritonit (% 93,7), artrit (% 47,4), plörezi (% 31,2) ve raş (% 20,9) olarak rapor etmiştir (78).

Ateş, çoğu kez ataklara eşlik eder ve bazen hastalığın tek belirtisi olabilir. Hafif ataklarda düşük seyredebilir fakat, genellikle 38-40° C civarındadır. Ateş 12 saatten üç güne kadar yüksek kalmakla birlikte, çoğunlukla ilk 24 saat içinde düşer (39).

AAA'da serozanın yangısına bağılı olarak ortaya çıkar. Karın boşluğunda yayılır ve nadiren yerleşik olarak kalarak, 1-3 gün arasında devam eden ve kendiliğinden geçer. Ağrı, hastanın günlük normal faaliyetlerine devam etmesine izin vermeyecek kadar şiddetlidir. Atakta periton boşluğunda fibrin ile polimorfonükleer hücreleri içeren steril eksuda oluşur ve bunun organizasyonu, nadiren primer periton adezyonlarına ve sindirim kanalında tıkanmalara yol açabilir (10,39). Kabızlık daha sık görülmesine rağmen, hastaların yüzde 10-20'sinde ataklar sırasında ishal gözlenebilir. Klinik tablo akut batına benzediğinden, bazen laparotomi ve apendektomiye başvurulmaktadır. AAA hastalarına apendektomi ameliyatı uygulayan merkezler olmuştur fakat, bu girişimin akut batının diğer sebeplerini dışlayamaması ve ameliyat sonrasında oluşan fibrotik bantların sindirim kanalında tıkanmalara zemin hazırlaması dolayısıyla, apendektomi önerilen bir yöntem olmamıştır (79).

Eklem atakları, batında görülen belirtilerin ardından ikinci sıklıkta görülür. AAA olan Sefardik Yahudilerin yüzde 75'inde görülen artrit, yüzde 16'sında ilk belirti olarak ortaya çıkmaktadır (80,81). Eklem bulguları Türklere % 47,4 (78), Araplarda ve Ermenilerde % 37 (82,83) oranında görülmektedir. Alt ekstremitelerde diz, ayak bileği gibi büyük eklemleri tutan, sekel bırakmadan iyileşen, eklemde ağrı, kızarıklık, ısı artışına yol açan, sistemik ateşin eşlik ettiği mono artrit görülebilir. Akut mono artrit spontan oluşmakla birlikte, bu durumun travmayı veya uzun süren egzersizin eklem bulgularını tetikleyebileceği unutulmamalıdır. Bunun yanı sıra, komşu kaslarda atrofi ve belirgin osteoporoz görülebilir. Bazı kronik mono artrit vakalarında, özellikle kalça eklemde ve nadir olarak diğer eklemlerde ankiyoza giden kalıcı şekil bozuklukları gelişebilir.

AAA'da görülen artrit bir diğer şekliyse, gezici poliartrittir. Bu vakalar yanlılıkla akut romatizmal ateş (ARA) ve juvenil idiyopatik artrit (JIA) tanısı aldıkları için, ayırıcı tanı önem kazanmıştır. AAA tanısı alan ve artritli olan hastalarda, hastalık başlangıç yaşının artritli olmayan gruba göre daha düşük olduğu ve eritem benzeri erizipelin, miyaljinin ve vaskülitin artritli grupta daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (78).

AAA'ya bağlı göğüs ağrısı, AAA'nın sık görülen belirtilerinden biridir ve diyaframda irritasyon varsa, omuzda ağrı hissedilebilir. Göğüs ağrısı, genellikle plevradaki yangıya bağlı olarak görülmekle birlikte, bazı ataklarda perikardite de rastlanır. Perikardit, AAA'lı hastaların yüzde 0,7-1,4'ünde gelişir. Tekrarlayan perikardiyal ataklar, nadiren konstriktif perikardit ve perikardiyal tamponada yol açar (84).

AAA'nın en karakteristik cilt lezyonu, erizipel benzeri eritemdir. Yahudilerde % 46 (80), Türklerde % 21 (78), Ermenilerde % 8 (82) ve Araplarda % 3 (83) oranında görülür. Lezyon genellikle bacağın ön yüzünde, ayak bileğinde ve ayak sırtında pembe-mor renkli, ciltten hafif kabarık eritem şeklindedir.

Miyalji, AAA'nın sık görülmeyen bulgularından biridir. Egzersiz sonrası alt ekstremitelerde olan bu tip miyaljiye ateş eşlik etmez ve bu durum dinlenmekle geçer. Uzamış febril miyalji olarak isimlendirilen tablo ise, yüksek doz steroid tedavisine ihtiyaç duyar ve tedavi edilmezse altı haftaya kadar uzayabilir (85).

Kolşisin miyopatisi ise, böbrek işlevleri bozulmuş olan hastalarda görülür. Miyopatide kas enzimleri yükselir, elektromiyografide miyopatik kalıp ve anormal ani kasılma etkinliği vardır. Kas biyopsisinde, miyositlerde lizozom birikiminin ve otofajik vakuollerin olduğu görülür (79).

Splenomegali, diğer bir nadir görülen bulgudur. Hastaların yaklaşık yüzde 30'unda ve çoğunlukla yangısal reaksiyona ikincil olarak görülmektedir. Nadiren, amiloidozise bağlı olarak da ortaya çıkabilir. Tunika vajinalisin yangısına bağlı febril skrotum atakları, özellikle çocuk ve gençlerde görülür. Bu ataklar, skrotumda akut başlayan, tek taraflı ağrı ve şişlik özelliğindedir (79).

Vaskülit, AAA'nın seyrinde normal popülasyona göre daha sık görülür. Henoch-Schlöein purpurası (HSP) ve poliarteritis nodoza (PAN) görülme sıklıkları, genel popülasyonda sırasıyla 8/1000 ve 6/100.000 iken, Türk AAA çalışma grubunun verilerine göre, hasta grubunda bu oran sırasıyla 2.7/100 ve 9/1000 olarak bulunmuştur

çet hastalığı, sistemik lupus eritematozus (SLE), akut kronik spondilartropatiler, streptokoks enfeksiyonu ve akut glomerülonefrit ve yangısal bağırsak hastalıkları ile AAA'nın bir arada görüldüğü rapor edilmiştir (78, 87-89). AAA hastalarında IgA nefropatisi, IgM nefropatisi, hızlı ilerleyen glomerülonefrit, yaygın çoğalmı glomerülonefrit ve odakal çoğalmı glomerülonefrit gibi amiloid dışı diğer bazı glomerüler hastalıklar da görülebilir (90-95). Bu glomerüler hastalıklarla AAA'nın bir arada bulunuşu daha ziyade AAA'nın bir dışavurum olarak kabul edilmektedir (96).

AAA'nın en önemli komplikasyonlarından biri de, kronik böbrek yetmezliğine yol açan ikincil amiloidozdur. Amiloidoz, organ ve dokularda hücre dışı alanda erimeyen fibriler yapıda proteinlerin depolanması özelliğini taşıyan bir grup hastalığı tanımlamaktadır (97). İkincil veya tepkisel amiloidozda biriken öncül protein serum amiloid A (SAA)'dır. AAA'da görülen sekonder amiloidoz, genellikle böbrekleri etkiler, ayrıca karaciğer, dalak, adrenal bezler ve gastrointestinal sistemi, geç dönemde de kalp ve testisleri etkiler.

2.1.6. Laboratuvar

AAA tanısı için özgün bir laboratuvar testi yoktur. Akut yangıda artan lökosit, eritrosit sedimentasyon hızı, serum C-reaktif protein (CRP), fibrinojen, serüloplazmin, haptoglobülin ve SAA proteini gibi akut faz proteinleri, bu hastalıkta da artış gösterir ve sonrasında normale döner. Amiloidoz gelişen vakalarda ve akut atak döneminde proteinüri görülebilir.

2.1.7. Tanı

AAA hastalığının tanısı, klinik bulgular ve hasta izlemi ile konur. Tanı konmasında, Tel-Hashomer ölçütleriyle Livneh ve arkadaşlarının (98) yayınlamış olduğu tanı ölçütlerinden faydalanılmaktadır. Tel-Hashomer tanı ölçütlerinde, asıl ve yan ölçütler belirlenmiştir. Buna göre, kesin AAA tanısı için iki veya daha fazla asıl ölçüt veya bir asıl ve iki yan ölçüt, muhtemel AAA tanısı için bir asıl ve bir yan ölçüt gerekmektedir. Tel-Hashomer tanı ölçütleri, Tablo-1'de gösterilmiştir.

1. Peritonit, sinovit veya plevra yangısının eşlik ettiği ateş atakları
2. AA tipinde amiloidoz bulunması
3. Kolşisin tedavisine olumlu cevabın alınması

Yan Ölçütler

1. Tekrarlayan ateş atakları
2. Erizipel benzeri eritem
3. Birinci derece akrabalarda AAA öyküsü

İki veya daha fazla sayıda asıl ölçütü veya bir asıl ve iki yan ölçütler tanı konur. Bir asıl ve bir yan ölçütü, muhtemel tanı konur.

Avi Livneh ve arkadaşları (99), 1988’de büyük bir grup AAA hastasının yanı sıra AAA ile karışabilecek hastalıkları olan şahıslar üzerinde yaptıkları bir çalışmayla yeni tanı ölçütleri yayınlamışlardır. Günümüzde, çoğu merkez tarafından bu tanı ölçütleri kullanılmaktadır. Bu ölçütler, Tablo-2’de verilmiştir. Tanı ölçütleri içinde geçen tipik atak, ateşle beraber belirli sistemlerden bir ya da birden fazlasında yangı görülmesi özelliğini taşımaktadır. Yangı peritonit (yaygın), plevrit (tek taraflı), perikardit, mono artrit (diz, ayak bileği, kalça), tek taraflı orşit, erizipel benzeri eritem veya alt ekstremitelerde yaygın kas ağrısı şeklinde olabilir.

Tipik atak tanımı içinde yangı bölgelerinde şiddetli ağrının oluşması, atakların tekrarlanması (aynı tipte üç defadan fazla), atakların çoğuna ateşin eşlik etmesi (rektal ateşin 38°C’den yüksek olması) ve atağın kısa süreli olması (12 saat-3 gün) yer alır.

Kısmi ataklar ise, tipik atak özelliklerinden birini veya birkaçını göstermeyen ve tekrarlayan ağrılı ataklardır. Bu tip ataklarda, ateş normal olabilir ve atak daha kısa veya daha uzun süreyi kapsayabilir (altı saatten az ve bir haftadan fazla olmamak kaydıyla). Yangı belirtileri olmadan karın, göğüs, eklem ve skrotum bulguları vardır. Hastalar, yerleşik karın ağrısından şikayet eder. Tipik atakta tarif edilen yerleşimlerden farklı eklem tutulumları ve erizipel benzeri eritem görülür. Akut orşit tablosu, iki taraflı olarak

ite kaslarını tek taraflı şekilde tutan kas ağrısı da, kısmi (99). Bu tanı ölçütlerine göre yapılan tipik ve kısmi atak tanımlarına uymayan ataklar, AAA atağı olarak kabul edilmemelidir.

Tablo 2: Avi Livneh Tanı Ölçütleri

A. Asıl Ölçütler

Tipik ataklar

1. Yaygın peritonit
2. Tek taraflı plörezi ve perikardit
3. Mono artrit (kalça, diz ve ayak bileği eklemlerinde)
4. Tek başına ateş

B. Yan Ölçütler

Aşağıdaki bir veya daha fazla bölgenin kısmi atakları

1. Karın
2. Göğüs
3. Eklem
4. Egzersiz sonrası bacak ağrısı
5. Kolşisin tedavisine iyi cevap olması

C. Destekleyici Ölçütler

1. AAA aile öyküsü
2. Uygun etnik köken
3. Belirtilerin yirmi yaşından önce başlaması
4. Yatak istirahatı gerektirecek kadar şiddetli ağrı
5. Kendiliğinden iyileşme dönemine girmesi
6. Belirtisiz ara dönemler
7. Akut faz reaktanlarında anormallik

AAA TANISI İÇİN

Bir asıl ölçüt veya

İki yan ölçüt veya

Bir yan ve beş destekleyici ölçüt veya

Bir yan ve ilk beş destekleyici ölçütten dördünün olması gerekir.

2.1.8. Tedavi

Kolşisin daha önceleri gut tedavisinde kullanılmaktayken, ilk kez 1972 yılında Goldfinger (41), AAA hastalığı olan beş vakada kolşisinin tedavi edici etkisini tanımlamıştır. Kolşisin ve salisilamid kombinasyonu, AAA'lı hastalarda denenmiş olan fakat rutine girmeyen bir tedavi seçeneği olmuştur (100).

Günümüzde tedavide sıkça kullanılan kolşisinin, atakları ve amiloidoz gelişme riskini önlediği artık net olarak gösterilmiştir (5,101). Kolşisinin etki mekanizması ise, halen tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Bunun yanı sıra, bu ilacın atak sırasında artan kemotaktik etkinliği engelleyerek nötrofillerin yangı bölgesine göçünü durdurduğu ve adezyon moleküllerinin ifadesini engelleme yoluyla nötrofil-endotel hücresi etkileşimini azalttığı bilinmektedir (102).

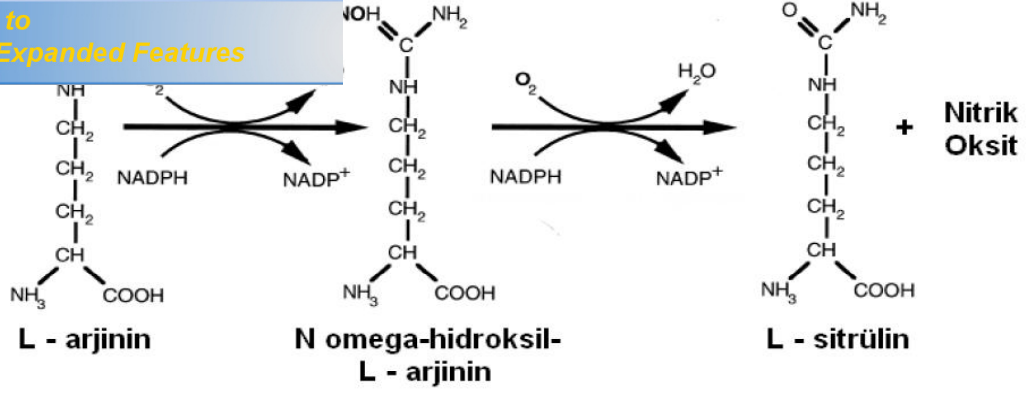
Kolşisin'e 1 mg/gün dozunda oral olarak başlanır ve kademeli olarak 1,5-2,0 mg/gün dozuna çıkarılabilir. Çocuklarda başlama dozu ise 0,5-1,0 mg/gündür. Kolşisin iyi tolere edilir ve çocuklarda kullanımı güvenlidir. Yüksek dozlarda ilaç alımına bağlı gelişen ishal, doz azaltılınca düzelir. Karaciğerde metabolize olur ve idrarla atılır. Karaciğer ve böbrek yetmezliği olanlarda doz ayarlaması yapılmazsa, geri dönüşlü miyopati ve nöropatiye yol açabilir (102).

NO, 1987 yılında kan damarlarının asetilkolin uygulaması sonrasında endotele bağlı şekilde gevşemesinden sorumlu molekül olarak keşfedilmiştir (103,104). Bundan kısa bir süre sonra, damar endotel hücrelerinden köken alan NO'nun L-arjinin amino asidinden sentezlendiği gösterildi (105). NO, yarı ömrü birkaç saniye olan, hızla çözünebilir, reaktif ve gaz halinde bir moleküldür. Günümüzde NO'nun memelilerdeki dolaşım, sinirsel işlev ve savunma gibi bazı olayları ve sistemleri de içine alan fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer aldığı ortaya çıkarılmıştır (106,107).

2.2.1. Nitrik Oksidin Biyosentezi ve NOS'un İzofomları

NO, L-arjininden üç farklı NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. İşlevsel yönden etkin olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi, dimerik şekilde bulunur. Her üç NOS monomerinin molekül yapısında da, oksijenaz içeren bir N-terminal ucu ve kalmodulin tanıma bölgesine sahip bir C-terminal ucu vardır. Enzimlerin redüktaz bölgesinde NADPH, flavin adenin dinükleotid ve flavin mononükleotid gibi bazı kofaktörler için bağlanma bölgeleri bulunurken, oksijenaz bölgesinde hem ve tetrahidrobiopterin (BH4) kofaktörlerinin yanı sıra, L-arjinin için de bağlanma sahaları vardır (108-111).

NO'nun L-arjininden sentezlenmesi, iki farklı reaksiyonla gerçekleşir. NOS monooksijenasyon-I reaksiyonu denilen birinci basamakta, L-arjinin NO sentezi için bir aracı olan N omega-hidroksil-L-arjinine dönüşür. Bu reaksiyon için, NADPH ve oksijen gerekir.



Şekil 2: Nitrik oksidin L-arjinin amino asidinden sentezlenmesi

Damar endotelinin yanı sıra merkezi ve periferik sinir sisteminde ilk keşfedilenler sırasıyla eNOS ve nNOS'tur. Günümüzde, bu enzimlerin çeşitli hücre ve doku tiplerinde üretildikleri bilinmektedir. NO'nun adı geçen NO sentazlar aracılığıyla üretilmesi, çoğunlukla enzim etkinliği seviyesinde düzenlenmektedir ve bu reaksiyonlarda, az miktarda NO üretilmektedir. Hücre içi kalsiyum iyon yoğun luğundaki değişiklikler, NO sentezinde anahtar bir role sahiptir.

2.3. İnsan iNOS Geninin Moleküler Biyolojisi

iNOS geni sitokinleri ve lipopolisakkaritleri (LPS) de içine alan bir dizi yangısal medyatörün transkripsiyonel kontrolü altındadır. İNOS'a ait cDNA'lar, sadece ilgili amino asit dizgelerindeki küçük farklılıklarla birlikte bazı dokulardan klonlanmıştır (112-115). Moleküler klonlama, iNOS geninin yaklaşık olarak 37 kilobaz uzunluğunda olduğunu ve 17. kromozomdaki 17cen-q11.2 konumunda yerleşik olduğunu ortaya çıkarmıştır (116,117). iNOS'un açık okuma çerçevesi 27 ekson tarafından kodlanmış olup, translasyon başlangıç ve bitiş eksonları sırasıyla 2 ve 27'dir (118). İnsan iNOS geninin bütün intron / ekson sınırları, iyi bilinen GT/AG donör/alıcı kuralına sıkı bir şekilde uymaktadır. Kodlama bölgesinin ve özellikle de kofaktör bağlanma bölgelerinin yapısı, insan nNOS ve eNOS enzimlerine çok benzerdir (119-121). iNOS cDNA probunun 3' ucunun kullanıldığı Southern Blot analizlerinde, nNOS ve eNOS için tekli bant sonucu çıkarken, iNOS'a ait 22-26 arası eksonlar için çoklu bant sonucu çıkmıştır (122,123).

öncüde mutasyona uğramış bir psödogenin, işlevsel iNOS geninde yerleşik olduğu, floresan hücre içi melezleştirme (FISH) analizi kullanılarak ortaya çıkarılmıştır (124). Biri malarya enfeksiyonuna karşı dirençte patofizyolojik öneme sahip olan üç değişik minör allel varyasyonu tarif edilmiştir (125-127). İnsan iNOS geninin farklı hücrelerde değişik şekillerde düzenlendiği rapor edilmiştir. İnsan ve fare iNOS öncül bölgeleri arasında belirgin farklılıkların olduğu, yapılan 3' analiziyle ortaya çıkmıştır. Buna göre, farelerde iNOS'un LPS ve interferon gammaya karşı uyarılabilmesi için öncül gen bölgesinin 5' ucunun proksimalinde yer alan 1,5 kilobazlık kısmı yeterli olabilirken, insan iNOS öncülü, LPS / IFN- γ 'den sorumlu olan (-1083'ten -1229'a kadar) bölgedeki nükleotid değişimleri dolayısıyla LPS / IFN- γ 'ye karşı cevapsız kalmaktadır (128,129).

Buna ek olarak interlökin-1 beta, tümör nekroz unsuru alfa ve interferon gamma tarafından uyarılan insan transkripsiyon unsuru NF- κ B, iNOS öncül bölgesine farelerdekinden daha zayıf bir şekilde bağlanmaktadır (130). Fakat, öncül gen bölgesinde -3.8 kilobaz ile -16 kilobaz arasında yer alan ve sitokinlere cevap veren cis-düzenleyici elementleri içeren üç bölge, sitokin uyarılabilirliğini tetiklemektedir (131,132). İnsan iNOS geni, ilginç şekilde insan eNOS genindekiyle aynı olan ve makaslama gerilimine cevap veren (GAGACC) elementini içermektedir, ancak bu element fare iNOS gen öncül bölgesinde bulunmamaktadır (133). NO üretiminin bu makas gerilim elementi tarafından başlatılması, lökosit adezyonunun, platelet birikiminin ve damar düz kas hücre çoğalımının engellenmesi yoluyla kalp-damar hastalıklarından korunulmasında anahtar bir role sahip gibi görünmektedir. İnsan iNOS gen öncül bölgesi, bugün bilinen en geniş ve karmaşık öncüllerden biri olup, sıkı bir şekilde kontrol edilen iNOS gen ifadesinin bir göstergesidir (134).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Çalışmamız için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 26.08.2010 tarih ve XIV sayılı toplantıda onay alınmış ve çalışma Helsinki Deklarasyonu kurallarına uygun olarak yapılmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onayları alınmıştır.

3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi

Süleyman Demirel Üniversitesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı tarafından AAA tanısıyla takip ve tedavi edilen hastalar çalışmaya alınmıştır. Çalışma 2010-2011 yılları arasında yapılmıştır. Ailevi Akdeniz Ateşi tanısı, Tel-Hashomer tanı ölçütlerinden faydalanılarak konulmuştur.

Kontrol grubu için, değerlendirme sırasında travma ve enfeksiyon gibi yangıya ait hikayesi ve klinik bulguları olmayan, kronik bir hastalığı bulunmayan, herhangi bir tıbbi tedavi almayan ve ailesinde AAA hikayesi olmayan 30 sağlam kişi seçilmiştir.

3.2. Hastaların Gruplandırılması

Toplam 60 hasta ve 30 sağlıklı kontrol, çalışmaya dahil edildi. AAA hastaları MEFV gen mutasyon analizleri yapılarak üç gruba ayrıldı. Ayrıca, bütün vakalar iNOS gen polimorfizmlerine göre CC, CT ve TT genotipli olarak sınıflandırıldı.

3.3. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanışı

MEFV gen mutasyonlarını tespit etmek için, 0,5 M Etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüpe 2 cc venöz kan örneği alındı. Hasta grubuna ait EDTA'lı kan örneklerinden DNA izole edildikten sonra, FMF gen dizileri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle in vitro olarak çoğaltıldı. Mutasyonlar, revers insitu hibridizasyon yöntemiyle (Vienna Lab. Austria marka FMF strip assay kiti) çalışıldı.

Belirlenmesi için, hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bütün 2 cc venöz kan örneği alındı. EDTA'lı kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. TNFS gen polimorfizmi, PCR-RFLP yöntemiyle belirlendi. Plazma NO seviyelerinin belirlenmesi için, hasta ve kontrol grubuna dahil edilenlerden EDTA'lı tüpe 2 cc venöz kan örneği alındı. Alınan örneklerin plazmaları ayrıldı.

3.4. DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan bireylerden EDTA'lı tüp içerisine 2 cc kan örneği alındı. Kandan DNA'nın izolasyonu için Invisorb® Spin Blood Mini Kit kullanıldı. Periferik kan lökositlerinden standart prosedüre göre DNA izolasyonu yapıldı ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Çalışmaya başlamadan önce örnek sayısına yetecek kadar **Elution Buffer** ependorf tüpüne kondu ve termomikser de 56°C ye kadar ısıtıldı.

1. 1,5 ml'lik Ependorf tüpüne 200 µl kan örneği, 200 µl lizis buffer A ve 20 µl proteinaz K kondu. Kapağı kapatılarak tüp kısaca vortekslendi. Lizis aşaması için termomikserde (Thermo-Rock, Sweden) 56°C'de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.

2. İnkübasyonun sonunda tüp içine 400 µl Binding Buffer eklendi ve 10 sn vortekslendi. Sıvının tamamı, RTA spin filtreli tüpe aktarıldı. Üç dakika oda sıcaklığında inkübe edilip 12000 rpmde 2 dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atılıp, spinfilterler içindeki materyalle birlikte yeni toplama tüpüne yerleştirildi.

3. Örneklerin üzerine 500 µl'lik wash buffer I eklendi ve 12.000 rpmde 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atılarak, toplama tüpleri değiştirildi.

4. Örneklerin üzerine 800 µl wash buffer II eklendi ve 12.000 rpmde bir dakika santrifüj edildi.

5. Filtre boş toplama tüpüne aktarılarak, 14.000 rpmde 4 dakika tekrar santrifüj edilerek alkolden arındırıldı.

6. Filtre temiz 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve alkolün tamamen uzaklaşması için, 3 dakika kapak açık biçimde oda sıcaklığında inkübe edildi.

ortasına ısıtılmış 56°C’de 200 µl elution buffer D eklendi
kübe edildi.

8. Sonrasında 10.000 rpmde 1 dakika santrifüj edilerek filtre atıldı ve tüp
içerisindeki ekstrakt (DNA) alınıp -20°C’de saklandı.

3.5. MEFV Gen Mutasyonlarının Belirlenmesi

3.5.1. Çoklu-PCR Amplifikasyonu

MEFV gen zincirlerine çift primerler kullanılarak, PCR multipleks tekniği ile in vitro amplifikasyon yapıldı. Reaksiyonda, MEFV genine ait E148Q, P369S, F479L, M680I (G>C), M680I (G>A), I692del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S ve R761H mutasyonları için primerleri ve dNTP’leri içeren üretici firma tarafından hazırlanan FMF amplifikasyon karışımı kullanıldı.

Her örnek için, PCR toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde ependorf tüp içine 15 µl amplifikasyon karışımı (Vienna Lab, Austria), 5 µl taq polimeraz (Applied Biosystems, Germany) ve 5 µl DNA koyularak hazırlandı. PCR’da kullanılacak malzemeler çalışma esnasında buz üzerinde muhafaza edildi.

Tablo 3: Bir hasta için FMF strip assay içeriği

Reaktifler	Karışım
FMF Amplifikasyon Miksi	15 µl
Taq Dilüsyon Buffer	4,8 µl
Taq DNA Polimeraz	0,2 µl
Kalıp DNA	5 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	25 µl

PCR karışımını içeren tüpler, “termal cycler”a (Applied Biosystems, Germany) yerleştirildi ve PCR ilk siklusta 94°C’ de 2 dakika denaturasyonu takiben, 94 °C de 15 saniye (denatürasyon), 58°C’ de 30 saniye (annealing) ve 72 °C’de 30 saniye (extend, elongation: uzama) olacak şekilde 35 siklusta yapıldı. Son sikludan sonra 72 °C’de 180 saniye süren bir siklus daha yapılarak tamamlandı (Tablo 4).

94 °C	02:00 dakika
94 °C	00:15 saniye
58 °C	00:30 saniye
72 °C	00:30 saniye
72 °C	03:00 dakika
4 °C	∞

} 35 Döngü



Resim 1: Termal cycler cihazı

3.5.2. Agaroz Jel Elektroforeziyle PCR kontrolü

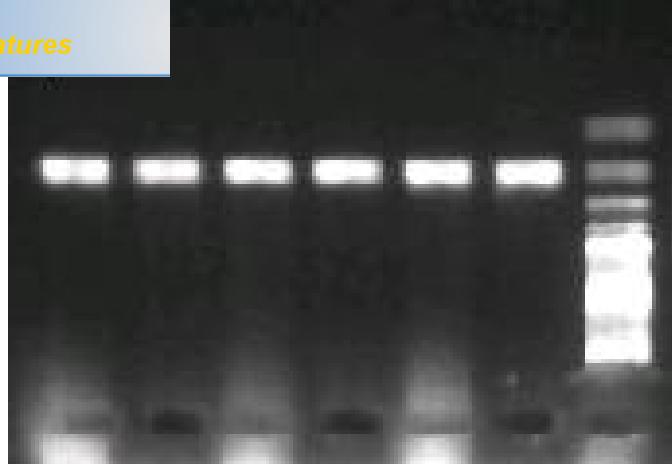
TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Tamponu: Stok çözelti (10x, pH 8.0), 121.10 gram Tris aminometan, 61.83 gram Borik asit, 4 gram EDTA tartılıp distile suyla hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti distile su ile 10 kat seyreltilerek kullanıldı.

	% 2'lik 25 ml
Agaroz	0,5 gr
1xTBE Tamponu	25 ml
Etidyum Bromür	2 µl

1. Gerekli miktarda agaroz tartılıp, erlene koyuldu.
2. Gerekli miktarda TBE eklendi.
3. Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyuldu.
4. Mikrodalga fırın örnek kaynamaya başlayana kadar yüksek ayarda açıldı.
5. Erlen, aralıklarla mikrodalgadan çıkarılıp çalkalandı.
6. Kaynama başladıktan sonra mikrodalganın ayarı düşürüldü ve tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtıldı.
7. Etidyum Bromür ortama eklendi ve çalkalama yoluyla tüm çözeltiye dağılması sağlandı.
8. Çözelti, trayın çatlamaması için muslukta biraz soğutuldu.
9. Çözelti traye yavaşça döküldü ve çözeltinin polimerize olması için en az onbeş dakika beklendi.

3.5.4. Örnek Yükleme Tamponu (Loading Dye)

50 µl % 1'lik Bromfenol blue, 50 µl %1'lik Ksilen siyanol, 10 µl % 50'lik Gliserol ve 880 µl % 10'luk Tris-EDTA pH 8 kullanılarak hazırlandı. PCR ürünleri örnek yükleme tamponuyla 5/1 oranında karıştırılarak jele yüklendi ve 80 voltta 20 dakika yürütüldü. Jel, Kodak Image Station 2000MM cihazında görüntülenerek PCR'de amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.



Resim 2: Agaroz jelde DNA örnekleri

3.5.5. Revers İn situ Hibridizasyon Yöntemi

Çalışmaya başlamadan önce Hibridizasyon Solüsyonu ve Wash Solüsyon A, autolipanın sıcak bloğu üzerine yerleştirildi ve Autolipa'da Viennalab ürünleri için uygun program seçilerek, cihaz 45 °C'ye kadar ısıtıldı. Diğer solüsyonlarsa, oda ısısında bekletilerek ısıtıldı.

FMF StripAssay çalışılırken her bir strip için 10 µl DNAT solüsyonu striplerin yerleştirildiği trayin kuyucuklarının köşelerine pipetlendi. DNAT solüsyonu 10 µl PCR ürünü pipetlenerek kuyucukta karıştırıldı. PCR ürünleri, oda sıcaklığında beş dakika inkübe edilerek denatüre edildi.

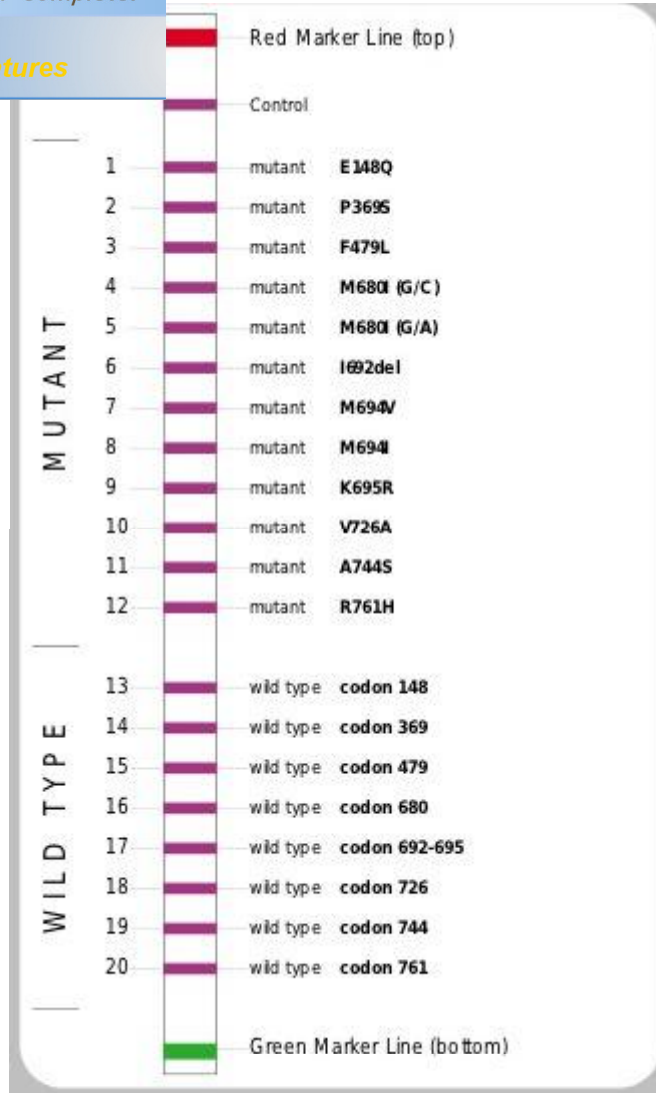
Bundan sonraki aşamalar, Autolipa cihazında çalışıldı. Programa göre, örneklerin konulduğu kuyucuklara önceden ısıtılmış 45 °C'de 1 ml hibridizasyon solüsyonu dikkatlice konuldu ve homojen renk elde edilene kadar yavaşça çalkalandı. Stripler, mat yüzeyleri üstte olacak şekilde dikkatlice kuyularına yerleştirildi ve 45 °C'de 30 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Hibridizasyon solüsyonu, kuyucuklardan tamamen boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 45 °C'de 1 ml Wash solüsyonu A ilave edilerek, 10 saniye inkübe edildi. Kuyucuklardan Wash solüsyon A boşaltıldı. 1 ml wash solüsyonu A tekrar ilave edilerek, 15 dakika çalkalamalı inkübe edildi. Solüsyon tekrar boşaltılarak, 1 ml wash solüsyon A ilave edildi.

°C’de çalkalanarak, hibridize olmayan PCR rnlerinin landı. Wash solüsyon A, kuyucuklardan tamamen madan sonra oda sıcaklığında (26 °C) devam etti. Her bir kuyucuktaki strip üzerine konjugat solüsyonu eklendi ve karışım 15 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra, konjugat solüsyonu boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 1 ml Wash solüsyonu B ilave edilerek, karışım 10 saniye inkübe edildi. Kuyucuklardan Wash solüsyon B boşaltıldı. Ortama 1 ml wash solüsyonu B tekrar ilave edilerek, 5 dakika çalkalamalı inkübe edildi. Wash solüsyonu B daha sonra tekrar boşaltılarak, 1 ml wash solüsyon B ilave edildi. Bu solüsyon beş dakika çalkalanarak, konjugat solüsyonunun tamamen uzaklaştırılması sağlandı ve kuyucuklar boşaltıldı.

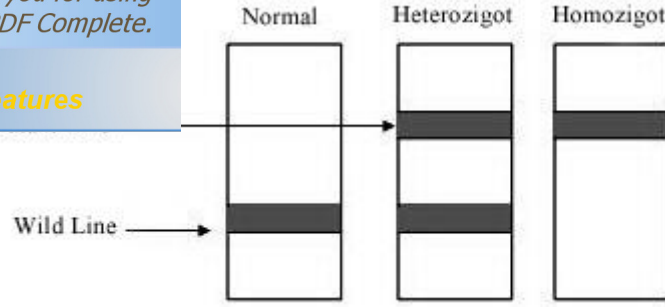
Her bir strip üzerine, 1 ml color developer solüsyonu eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında bantların oluşması için strip-developer 15 dakika boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Color developer, ortamdan tamamen uzaklaştırıldı. zerinde bantlar oluşan stripler, iki kez distile su ile yıkanarak karanlıkta kurutuldu.

3.5.6. Sonuçların Okunması

Stripler hibridizasyon sonrasında kolektör kağıtlarına yapıştırlarak sonuçlar yorumlandı. En baştaki pozitif reaksiyon kontrol bandı, konjugat ve color developer aşamalarının doğruluğunu gösterir. Bu bant daima oluşmalıdır. FMF stripleri ve strip üzerindeki mutant tip ve wild tipleri gösteren bantlar, Şekil 3'te gösterilmiştir. Normal bireylerin genotipleri için sadece wild (vahşi) bantlar, heterozigot bireyler için hem wild ve hem de mutant tipte bantlar, homozigot bireyler için sadece mutant bantların pozitif olması gerekmektedir (Şekil 4 ve Tablo 5).



Şekil 3: FMF strip assay



Şekil 4: Wild ve mutant bandlar

Tablo 5: Revers hibridizasyonda, wild ve mutant band tiplerine göre genotiplendirme

	Wild tip band	Mutant band	Genotip
Normal	Pozitif	Negatif	Normal Birey
Homozigot	Pozitif	Pozitif	Heterozigot Birey
Heterozigot	Negatif	Pozitif	Homozigot Birey

3.6. iNOS Gen Polimorfizmi

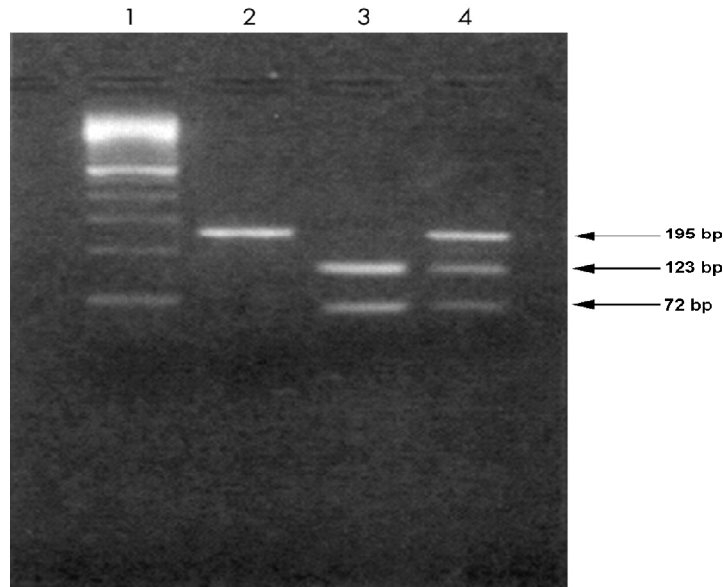
iNOS gen polimorfizmi, PCR-RFLP yöntemiyle belirlenmiştir. Bu işlemde, iNOS genine ait Ex16+14C T bölgesine bakıldı. PCR işlemi 20-100 ng DNA, 100 µm dNTPs, 20 pmol primer (Forward ve Reverse primer), 1,5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl PH 8,6 , 50 mM KCl, 1 U Taq polymerase (MBI Fermentas) içerecek şekilde 25 µl hacminde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerlerin dizilimi şu şekildedir:

Forward Primer: 5'-CTG TGA GCC TTC TCC TGC AAG -3'

Reverse Primer: 5'-GGC AGG GCT AGG AGT AGG AC-3'

PCR 95°C'de 5 dakika ilk denaturasyondan sonra, 35 siklus; 95°C'de 1 dakika denaturasyon, 60 °C'de 45 saniye primer bağlanma (annealing) ve 72°C'de 1 dakika sentezi (extension), en son 1 siklus 72°C'de 7 dakika son sentez işlemleriyle gerçekleştirilmiştir.

agaroz jelde 80 Volttan 20 dakikalık elektroforez işleminden sonra görüntülenmiştir. RFLP işlemi, 10 µl PCR ürününün üzerine 50 Usp5071 restriksiyon enzimi (New England Biolabs) ile 65°C de bir gece boyunca inkübasyonla gerçekleştirilmiştir. RFLP sonucu, 0.5 mg/ml ethidium bromide içeren, % 3'lük agaroz jelde 100 Voltta 40 dakikalık elektroforez işleminden sonra gözlenmiştir. Tüm değerlendirmelerde 100 bp'lik marker (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas) kullanılmıştır. UV ışık kullanılarak jel görüntüleme sistemiyle (Kodak IMAGE 2000MM) genotipler belirlenmiştir. PCR sonunda 195 bp'lik ürün oluşmuştur. Enzim kesimi sonrasında 123 ve 72 bp'lik ürünler oluşmuştur (Resim 3).

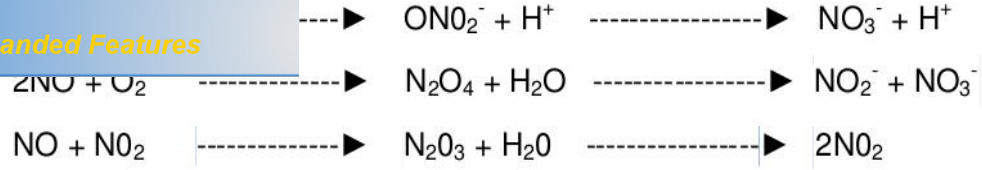


Resim 3: Enzim kesimi sonrasında oluşan ürünlerin jel elektroforez ortamındaki görüntüsüne ait fotoğraf.

3.7. Plazma Nitrik Oksit (NO) Seviyesinin Ölçülmesi

3.7.1. Deneyin İlkesi

Vücutta in vivo ortamda üretilen NO, hızlı parakrin etki gösterir. NO, guanilat siklaz enziminin prostetik grubuyla reaksiyona girerek enzimi etkinleştirir ve cGMP seviyelerinde artışa yol açar. NO, aynı zamanda vücut sıvılarında bulunan bazı moleküllerle de reaksiyon verir. Bu reaksiyonları, şu şekilde sıralayabiliriz:



Ölçüm yönteminde, iki basamaklı bir tepkime sürecinden faydalanılır. Birinci basamakta nitrat, nitrat redüktaz aracılığıyla nitrite dönüştürülür. İkinci basamakta ise, ortama nitriti koyu mor renkli azot bileşenine dönüştüren Griess Reaktifi eklenir. Bu bileşenin abzorbansı ölçülerek, NO iyon yoğunluğu hesaplanmış olur.

3.7.2. Nitrat Standart Eğrisinin Hazırlanması

Ölçümü yapılacak örneklerdeki nitrat+nitrit yoğunluklarının belirlenebilmesi için, önce bir nitrat standart eğrisi hazırlandı. Temiz bir deney tüpünün içine 0,9 ml deney tamponu ve 0,1 ml nitrat standardı eklendi ve bu karışım çalkalandı. Bu standardın yoğunluğu 200 mikromolardı. Standart eğrisi, aşağıdaki reaktiflerin eklenmesi yoluyla hazırlandı:

Kuyucuk	Nitrat Standardı (µl)	Deney Tamponu (µl)	Son Nitrat Yoğunluğu
A1, A2	0	80	0
B1, B2	5	75	5
C1, C2	10	70	10
D1, D2	15	65	15
E1, E2	20	60	20
F1, F2	25	55	25
G1, G2	30	50	30
H1, H2	35	45	35

Azırlanmış olan standartlardan 80 mikrolitre konuldu. Santrifüj yardımıyla 10-30 kDa'lık moleköl ağırlıklarına sahip partikülleri ayrıldı.

3.7.4. Ölçüm İşlemi

Ölçüm işleminde, 96 kuyucuklu plate kullanıldı. İki kuyucuk absorbans körü olarak ayrıldı ve standartlarla serum örneklerinin yerleri belirlendi. Daha sonra, şu basamaklar takip edildi:

- Kör (blank) kuyucuklarına 200 mikrolitre deney tamponu kondu.
- Toplam yedi adet standart kuyucuğu vardı. Her bir standart kuyucuğuna, hazırlanmış olan standartlardan 80 mikrolitre konuldu.
- Diğer kuyucuklara ise, ölçümü yapılacak örnekten konularak üstüne deney tamponu eklendi ve son hacim 80 mikrolitreye tamamlandı.
- Her bir kuyucuğa, 10 mikrolitre enzim kofaktör karışımı eklendi.
- Daha sonra, örnek içeren kuyucuklara 10 mikrolitre Nitrat Redüktaz karışımı eklendi.
- Platenin kapağı kapatıldı ve örnekler, oda sıcaklığı ortamında bir saat tutuldu.
- Enküasyon sonrasında, kuyucuklara 50 mikrolitre Griess Reaktanı – R1 ve R2 eklendi.
- Renk oluşumu için on dakika beklendikten sonra, örneklerin absorbans değerleri bir plate okuyucusunda ve 540-550 nm dalgaboyu aralığında okundu.

3.7.5. NO Değerinin Hesaplanması

Kör (blank) kuyucuklarından elde edilen değer, örnek içeren diğer kuyucuklardan ölçülen ortalama emilim (absorbans) değerlerinden çıkarıldı.

ışareleme noktası olarak, 540 veya 550 nanometrelik dalgaboyu emilim değeri referans olarak alındı ve aşağıdaki formül kullanıldı:

$$[\text{Nitrat} + \text{Nitrit}] (\text{uM}) = [(A_{540} - y \text{ kesişme noktası}) / \text{Eğim Açıısı}] \times [200 \text{ ul} / \text{Örnek hacmi}] \times \text{Seyreltme Oranı}$$

$$[\text{Nitrit}] (\text{uM}) = [(A_{540} - y \text{ kesişme noktası}) / \text{Eğim Açıısı}] \times [200 \text{ ul} / \text{Örnek hacmi}] \times \text{Seyreltme Oranı}$$

$$[\text{Nitrat}] (\text{uM}) = [\text{Nitrat} + \text{Nitrit}] - [\text{Nitrit}]$$

3.8. İstatistik Analiz

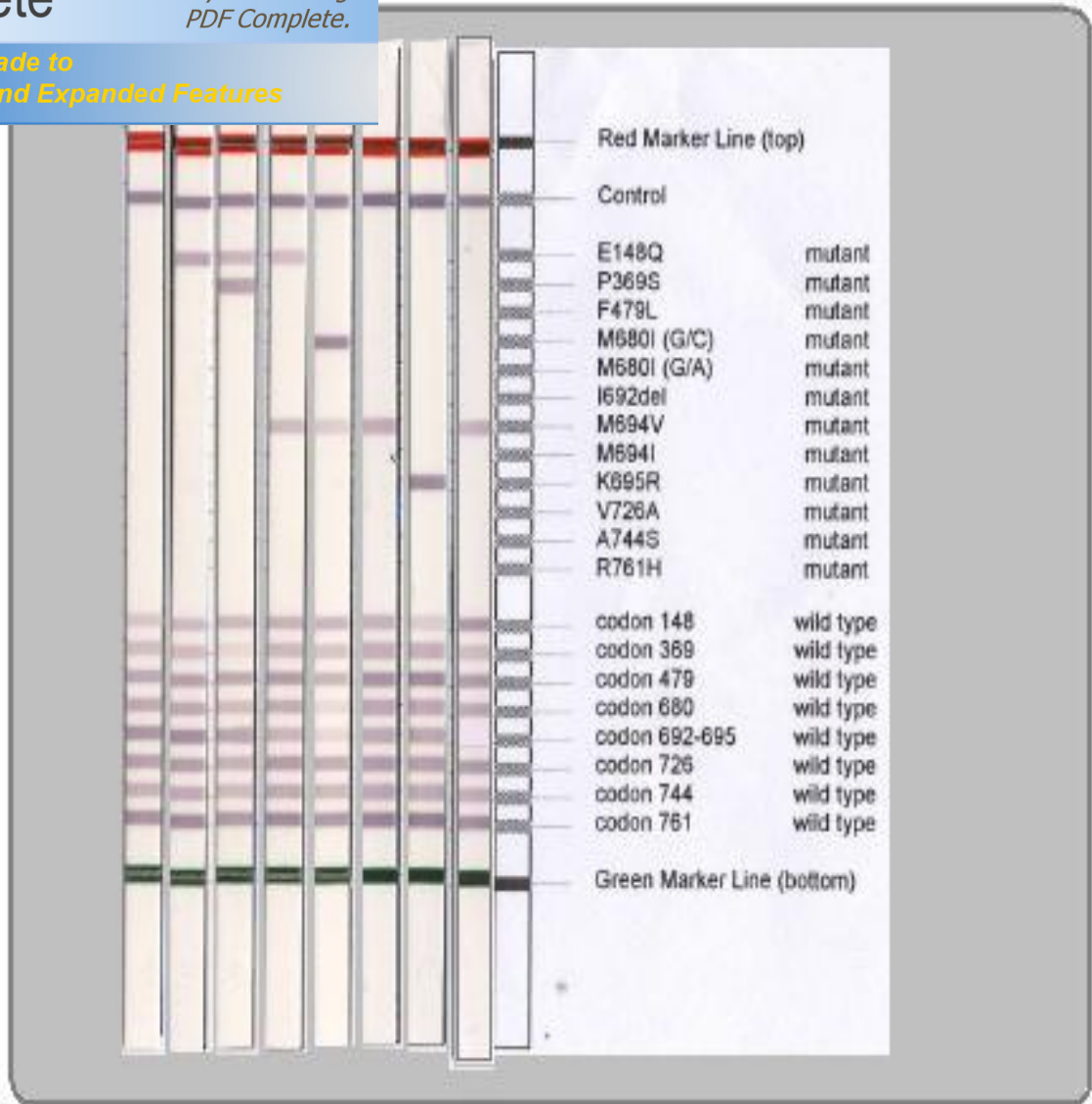
İstatistik değerlendirmeler, SPSS 17.0 ve OpenStat 11.9 yazılımları kullanılarak yapıldı. Grup içi ve gruplar arası yüzdellik değerlerinin birbiriyle karşılaştırılmasında, Ki-kare testi uygulandı. Nitrik oksit ölçümüne ait ortalama değerlerin analizinde, Student-t testi uygulandı. Elde edilen değerler, ortalama \pm standart sapma olarak verildi ve 0,05'in altındaki P değerleri, istatistik açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) grubunda, 29 erkek ve 31 kadın mevcuttu. Hasta grubunda erkeklerin yaş ortalaması $31,03 \pm 11,57$ yıl, kadınların yaş ortalaması $34,22 \pm 10,92$ yıl ve genel yaş ortalaması da $32,68 \pm 11,26$ yıldır. Kontrol grubunda ise, 13 erkek ve 17 kadın mevcuttu ve yaş ortalamaları erkeklerde $36,07 \pm 9,72$ yıl, kadınlarda $34,82 \pm 9,30$ yıl ve toplamda da $35,36 \pm 9,34$ yıldır. AAA ve kontrol grubu arasında, cinsiyet ($p = 0,6558$) ve yaş ($p = 0,1232$) açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

FMF strip assay kitlerinin prosedürüne göre multipleks PCR ve hibridizasyon yapılarak şekilde görüldüğü gibi FMF stripleri üzerinde konjugat-substrat reaksiyonun ürünü renk oluşumu gözlemlendi ve bireylerin mutasyon analizi yapıldı (Resim 4).

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) grubundaki 60 vaka MEFV gen mutasyonları açısından değerlendirildiği zaman, M694V homozigot mutasyonu olan 14 hasta (% 23,33), M694V heterozigot mutasyonu olan 10 hasta (% 16,67), M694V bileşik heterozigot mutasyonu olan 12 hasta (% 20), diğer bileşik heterozigot mutasyonu olan 3 hasta (% 5) ve diğer heterozigot mutasyonu olan 21 hasta (% 35) bulundu. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) grubunun, cinsiyet, MEFV gen mutasyonu ve iNOS genotipi, Tablo 6'da özetlenmiştir.



Resim 4: Normal, heterozigot, birleşik heterozigot ve homozigot mutasyonları gösteren FMF Strip Assay.

No	Adı Soyadı	Cinsiyet	Yaş	MEFV gen mutasyonu	İNOS genotipi
1	I.B.	K	32	M694V Homozigot	CC
2	B.Ç.	E	30	M694V Homozigot	CC
3	A.O.A	E	26	M694V Homozigot	CC
4	H.A.	K	24	M694V Homozigot	CC
5	M.A.	E	53	M694V Homozigot	CC
6	A.B.	K	38	M694V Homozigot	CC
7	H.T.	K	55	M694V Homozigot	CC
8	S.T.	K	35	M694V Homozigot	CT
9	M.E.Ç.	E	19	M694V Homozigot	CC
10	E.N.Ç.	K	19	M694V Homozigot	CC
11	Ç.E.	K	38	M694V Homozigot	CT
12	M.E.	E	58	M694V Homozigot	CC
13	S.G.	E	18	M694V Homozigot	CT
14	Z.U.	K	40	M694V Homozigot	CC
15	F.Y.	E	35	M694V Heterozigot	CT
16	D.F.A.	K	55	M694V Heterozigot	CC
17	P.Ş.	K	58	M694V Heterozigot	CT
18	S.Ş.	K	23	M694V Heterozigot	CT
19	H.H.U.	E	35	M694V Heterozigot	TT
20	M.H.Ö.	E	46	M694V Heterozigot	CC
21	C.G.	E	20	M694V Heterozigot	TT
22	H.E.T.	K	18	M694V Heterozigot	CT
23	B.Ç.	K	24	M694V Heterozigot	CC
24	A.B.G.	K	30	M694V Heterozigot	CC
25	İ.Ç.	K	33	M694V Heterozigot,E148Q Heterozigot	CC
26	H.G.	E	21	M694V Heterozigot,M680I Heterozigot	CT
27	F.G	K	19	M694V Heterozigot,M680I Heterozigot	TT
28	H.G.	E	37	M694V Heterozigot,E148Q Heterozigot	CC
29	Z.A.	K	40	M694V Heterozigot,E148Q Heterozigot	CC
30	Ş.T.	K	27	M694V Heterozigot,E148QHeterozigot	CC
31	M.Ö.	E	37	M694V Heterozigot,M680I Heterozigot	CT
32	Y.E.E	E	22	M694V Heterozigot,K695R Heterozigot	CT

			25	M694V Heterozigot,M694I Heterozigot	TT
			36	M694V Heterozigot,K695R Heterozigot	CT
35	C.K.		40	M694V Heterozigot,K695R Heterozigot	CT
36	M.G.	K	37	M694V Heterozigot,E148Q Heterozigot	TT
37	Ü.A.	K	44	P369S Homozigot	CT
38	A.M.	K	54	V726A Homozigot	CT
39	F.E.	K	30	P369S Homozigot	CC
40	M.Ö.	E	24	V726A Heterozigot	CT
41	H.D.	E	18	E148Q Heterozigot	CC
42	V.A.	E	49	V726A Heterozigot	CT
43	R.Ö.	K	39	P369S Heterozigot	CC
44	F.A.	E	18	V726A Heterozigot	CC
45	L.A.	K	26	M694I Heterozigot	CC
46	G.Ö.	E	35	E148Q Heterozigot	CT
47	R.K.	K	29	E148Q Heterozigot	TT
48	M.B.	E	52	M680I Heterozigot	CC
49	E.Y.	E	23	M680I Heterozigot	CC
50	B.K.	E	24	F479L Heterozigot	TT
51	K.K.	E	35	E148Q Heterozigot	CT
52	A.G.	K	38	E148Q Heterozigot	CC
53	R.B.G.	K	30	F479L Heterozigot	CC
54	A.Ö.	E	32	E148Q Heterozigot	CC
55	H.A.	K	20	V726A Heterozigot,P369S Heterozigot	CC
56	D.A	E	25	V726A Heterozigot,P369S Heterozigot	CC
57	F.E.	K	36	V726A Heterozigot,F479L Heterozigot	CC
58	M.B.Ş	E	18	E148Q Heterozigot,P369S Heterozigot	CC
59	K.S.	K	30	E148Q Heterozigot,P369S Heterozigot	CC
60	M.K.	E	29	E148Q Heterozigot,P369S Heterozigot	CC

arak değerlendirildiğinde iNOS genotipi 33 vakada CC (% 55), 18 olguda CT (% 28,33), 9 olguda TT (% 15) olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise, iNOS genotipi 20 olguda CC (% 66,7) , 7 olguda CT (% 23,3) ve 3 olguda da TT (% 10) olarak bulunmuştur (Tablo 7). Kontrol grubuyla AAA grubu arasında CC ($p = 0,2917$), CT ($p = 0,5080$) ve TT ($p = 0,5130$) gen polimorfizmleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Tablo 7: Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) ile kontrol grubunun İNOS genotipinin karşılaştırılması

	İNOS Genotipi		
	CC	CT	TT
AAA Grubu (n:60)	33	18	9
Kontrol Grubu (n:30)	20	7	3

AAA grubu kendi içinde değerlendirildiği zaman, 17 adet homozigot (% 28,33) ve 43 adet heterozigot (% 71,67) MEFV mutasyonunun olduğu, homozigot mutasyonlardan 12 vakanın CC (% 70,58) ve 5 vakanın CT (% 29,41) iNOS genotipinde olduğu, heterozigot mutasyonu olan toplam 43 vakanın 21'inin CC (% 48,83), 13'ünün CT (% 30,23) ve 9'unun da TT (% 20,94) genotipini taşıdığı bulunmuştur (Tablo 8).

AAA grubu kendi içinde homozigot ve heterozigot mutasyonlar açısından karşılaştırıldığı zaman, CC ($p = 0,1302$) ve CT ($p = 0,9999$) polimorfizmleri açısından bir farklılık olmadığı, buna karşılık sadece TT ($p = 0,0425$) gen polimorfizmi bakımından homozigot ve heterozigot vakalar arasında istatistik açıdan anlamlı bir farklılığın olduğu bulunmuştur.

ışı (AAA) grubunda, iNOS homozigot ve heterozigot

	iNOS Genotipi		
	CC	CT	TT
AAA grubu (n:60)	33	18	9
Homozigot mutasyon (n:17)	12	5	0
Heterozigot mutasyon (n:43)	21	13	9
Kontrol grubu (n:30)	20	7	3

Alınan kan örneklerinden nitrik oksit seviyeleri ölçüldü. Ortalama plazma nitrik oksit seviyeleri, FMF grubunda $1,91 \pm 0,79$ mM ve kontrol grubunda da $1,85 \pm 0,59$ mM'di. Nitrik oksit ölçümüne ait elde edilen ortalama değerler açısından, FMF ve kontrol grupları arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark yoktu ($p = 0,6434$).

AAA hastalığı, yurdumuzda sık gözlenen ve klinikte tanısı çoğu zaman güçlükle konabilen bir hastalık tablosudur. Klinik tanısı zor olan AAA hastalığının moleküler genetiğinin anlaşılması yönünde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ailevi Akdeniz Ateşi etyopatogenezine yönelik birçok hipotez ileri sürülmüş ve bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fakat, hastalığın patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (79,135-138).

AAA'dan sorumlu MEFV geninin sentezlediği p rin/mareonstrin proteininin yangıya aracılık ettiği düşünülmektedir (8,9). Güncel görüş, MEFV genindeki mutasyonlarla sentezi bozulan pirin/mareonstrin proteininin yangıyı yeterince baskılayamadığı ve bunun sonucunda AAA ataklarının geliştiği şeklinde-dir (FMF-1617, 5,6). Fakat, henüz pirin / mareonstrin proteininin yangısal reaksiyonun hangi basamağında rolü olduğunu gösteren yeterli veri bulunmamaktadır.

MEFV genine bağlı olarak ortaya çıkan ve 76 tane mutasyon rapor edilen bu hastalıkta aynı anda farklı mutasyonların tanısına izin veren yeni moleküler tanı testleri oldukça önemlidir. Son yıllarda 12 ayrı AAA mutasyonunun incelenmesine imkan sağlayan revers hibridizasyon tekniği bu anlamda oldukça kullanışlı bir teknik olarak ön plana çıkmıştır. Böylece, AAA'da en çok görülen 12 ayrı mutasyonun tanısına olanak kılan bu teknik aynı zamanda kombine heterozigotların tanısına da imkan sağlamıştır.

Bu çalışmada, toplumumuzda en fazla mutasyon gözlendiği rapor edilen MEFV genine ait dört ayrı mutasyon (M694V, E148Q, P369S ve V726A) ve ayrıca Türk popülasyon çalışmalarında daha az yer verilmiş olan A744S, P369S, F479L, M694I, M680I, K695R ve yerli literatürde şimdiye kadar bulunmayan I692del ve R761H mutasyonları, aynı anda 12 farklı mutasyon tipini belirlemeye imkan sağlayan FMF strip assay ile taranmıştır.

İncelenen verilere göre hasta grubumuzda belirlenen mutasyonlara ait görülme sıklıklarının yüzdeleri şu şekildedir: M694V % 40,15, E148Q % 17,94, M680I % 6,41, V726A % 9, P369S % 10,25, F479L % 3,84, K695R % 3,84 ve M694I % 2,57. Elde ettiğimiz sonuçlar, literatürdeki M694V mutasyon oranıyla uyumludur. Ülkemizde yayınlanan çoğu çalışmada, Türklerde en sık olarak M694V mutasyonunun görüldüğü gösterilmiştir.

Akar ve arkadaşları, FMF tanısı ile izledikleri 230 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada mutasyonların sıklık sırasına göre M694V (% 44), M680I (% 12), V726A (% 11), M694I (% 3) olarak belirtilmiştir (139). Bakkaloğlu'nun yaptığı bir çalışmada ise M694V % 51, M680I % 14, V726A % 9 oranında tespit edilmiştir (140). Topaloğlu ve arkadaşları ise, yapmış oldukları bir çalışmada mutasyon oranlarını şu şekilde rapor etmişlerdir: M694V % 51,2, M680I % 9,2, V726A % 2,9, E148Q % 3,6 ve M694I % 0,04 (141). Doğan Demir'in 123 hastadan oluşan çalışmasında ise, M694V % 57,7 ve M680I % 5,7 oranında rapor edilmiştir (142). Yeşilada ve ark., çalışmalarında P369S % 2,69, F479L % 0,54, M694I % 1,08 ve K695R % 1,08 olarak bildirmişlerdir (143). Türk FMF Çalışma Grubunun 2005 yılında yayınladığı 2838 hastayı kapsayan bir çalışmada, 1090 hasta allel frekansları açısından değerlendirilmiş ve M694V % 51,4, M680I % 14,4 ve V726A % 8,6 oranlarında bulunmuştur (46).

Kolşisinle in vitro ortamda yapılan çalışmalarda, kolşisinin kemotaksi esnasında lökositlerde oluşan mikrotübül oluşumunu engellediği ve bu yolla yangısal medyatörlerin salınımını azalttığı görülmüştür. Buradan hareketle, kolşisinin AAA ataklarını yangıyı baskılama yoluyla önlediği düşünülmektedir (102). AAA'da atak sırasında görülen klinik bulgular, tutulan organa göre değişen, ama sonuçta hep yangısal reaksiyon özelliğini taşıyan klinik tablolardır. AAA atağı, organizmada yangısal reaksiyonlarının alevlenmesiyle bulgu verir. Bu ataklar kontrol dışı yangısal cevap olarak kabul edilse de, organizmanın kendi engelleyici sistemleri ile belirli bir süre sonra baskılanır. Bundan dolayı, AAA ataklarının bilinen en önemli özelliği kendi kendini sınırlayabilmesidir (144).


yangısal olaylarda düzenleyici / aracı bir role sahiptir (145).
etkinleşmiş olan bağışıklık hücrelerinde etkinleşen
uyarılabılır nitrik oksit sentaz aracılığıyla önemli miktarda nitrik oksit üretimi
olmaktadır (146). Bunun yanı sıra, nitrik oksidin yangısal reaksiyonlara öncülük
etmesine tam zıt olarak yangıyı engelleyici özelliğinin de olduğu ve dolayısıyla iki yönlü
bir etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir (147).

Literatür araştırmamızda, AAA hastalığı ve nitrik oksit arasındaki bağlantıyı
inceleyen bir adet makaleye ulaştık. Bu makale, Panoissan ve arkadaşları tarafından
hazırlanmıştır. Panossian ve arkadaşları, yapmış oldukları bir çalışmada FMF
hastalarındaki bazal plazma NO seviyelerinin sağlıklı bireylerdekinden daha yüksek
olmadığını bildirmişlerdir (148). Biz de, yapmış olduğumuz çalışmada FMF ve kontrol
grupları arasında plazma NO seviyeleri açısından anlamlı bir farklılık olmadığını bulduk.
Bunun yanı sıra, mevcut çalışmamızda NO seviyelerine atak sırasında bakılmamıştır.

iNOS gen polimorfizminin, aralarında Parkinson hastalığının (149), mide
kanserinin (150), romatoid artrit (151), Henoch-Schonlein purpurasının (152), sıtmanı
(153), atopik hastalıkların (154), silikozis ve akciğer tüberkülozunun (155), dev hücreli
arteritin (156), Tip-I diyabetin (157) ve ürotelyal karsinomanın (Üro-iNOS) da olduğu
bir dizi hastalığın etyopatogenezinde yer aldığı düşünülmektedir.

Gerçekleştirdiğimiz literatür taramasında, AAA hastalığında çeşitli genlere (IL-4,
MEFV, SAA1, PON1 ve GPX1 gibi) ait polimorfizm örneklerinin incelenmesine yönelik
olarak gerçekleştirilmiş çeşitli çalışmalar olmasına rağmen, AAA hastalığında
uyarılabılır nitrik oksit sentaz (iNOS) geninde polimorfizm olup olmadığını inceleyen
bugüne dek yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Mevcut çalışmamızda, PCR-RFLP yöntemini kullanarak gerçekleştirmiş
olduğumuz ve iNOS geninde polimorfizm olup olmadığını ortaya çıkarmaya yönelik
analizde, AAA grubuyla kontrol grubu arasında bu yönden anlamlı bir farklılık
olmadığını bulduk.



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

li içinde homozigot ve heterozigot mutasyonlar açısından
T gen polimorfizmlerinde bu açıdan herhangi bir farklılık
olmadığını ve sadece T gen polimorfizminde bir farklılığın tespit ettik.

Bu çalışmanın sonucu olarak, AAA hastalığında nitrik oksit seviyelerinin normal bireylerdekine göre önemli bir değişiklik göstermediği ve AAA vakalarıyla kontrol grubu arasında iNOS gen polimorfizmi yönünden farklılık olmaması dolayısıyla, AAA hastalığında önemli ölçüde iNOS uyarımının ve dolayısıyla nitrik oksit üretiminin gerçekleşmediği söylenebilir.

6. ÖZET

Amaç: Ateşi (AAA) 12 ile 96 saat arası süren yangısal reaksiyon atakları, karın ve eklem ağrısı, halsizlik ve ateş yükselmesi belirtileriyle kendini gösteren bir rahatsızlıktır. Hastalığın etyolojisi ve kökeni, tam olarak bilinmemektedir. AAA hastalığının temel patogenezinde, 16. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan MEFV geninde mutasyon vardır. MEFV geni tarafından kodlanan bir proteinin, yangısal reaksiyonlara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Nitrik oksit, vücutta meydana gelen çok sayıda reaksiyonda yangısal medyatör olarak rol oynayan bir bileşendir. Bu çalışmada, nitrik oksit sentezinde anahtar konuma sahip olan uyarılabilir nitrik oksit sentazın (iNOS), yangısal atak özelliğine sahip olan AAA hastalığında polimorfizm geçirip geçirmediğini ve bunun plazma nitrik oksit seviyeleriyle olan bağlantısını incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Toplam 60 hasta ve 30 sağlıklı kontrol, çalışmaya dahil edildi. AAA hastaları, MEFV gen mutasyon analizleri yapılarak üç gruba ayrıldı. Ayrıca, bütün vakalar iNOS gen polimorfizmlerine göre CC, CT ve TT genotipli olarak sınıflandırıldı. MEFV gen mutasyonlarını tespit etmek için, FMF gen dizileri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle çoğaltıldı. Mutasyonlar, revers insitu hibridizasyon yöntemiyle çalışıldı. iNOS gen polimorfizmi, PCR-RFLP yöntemiyle belirlendi. Hasta ve kontrol grubuna dahil edilenlerden alınan kan örneklerinin plazmaları ayrıldı ve nitrik oksit seviyeleri ölçüldü. Elde edilen biyokimyasal ve genetik sonuçlar, istatistik analizden geçirildi.

Bulgular: Hastalardan 14'ü M694V homozigot (% 23,33), 10'u M694V heterozigot (% 16,67), 12'si M694V bileşik heterozigot (% 20), 3'ü diğer bileşik heterozigot (% 5) ve 21'i de diğer heterozigot mutasyon (% 35) taşımaktaydı. Grupların iNOS gen polimorfizmi sonuçlarının karşılaştırılmasında, kontrol ve AAA grupları arasında CC ($p = 0,2917$), CT ($p = 0,5080$) ve TT ($p = 0,5130$) açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı. Grupları arasında nitrik oksit seviyeleri açısından da anlamlı bir fark yoktu ($p = 0,6434$).



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

da nitrik oksit seviyelerinin normal bireylerdekine göre
mediği ve gruplar arasında iNOS gen polimorfizmi
yönünden farklılık olmadığı sonucuna varılabilir.

7. SUMMARY

Mediterranean Fever (FMF) is characterized by inflammation attacks, abdominal and articular pain, fatigue and fever manifestations lasting between 12 and 96 hours. The etiology and origin of FMF is unknown. In pathogenesis, there is a mutation in MEFV gene located at the short arm of the 16th chromosome. It has been found that a protein encoded by MEFV gene is effective against inflammatory reactions. Nitric oxide is an inflammatory mediator which involves in many reaction processes. In this study, we aimed to investigate if inducible nitric oxide synthase (iNOS) has undergone a polymorphism and whether there is a relation between a possible polymorphism and plasma nitric oxide levels.

Materials and Methods: A total of 60 patients and 30 healthy individuals were included in this study. FMF patients were separated into three groups according to MEFV gene mutation analysis. Furthermore, all participants were classified as having iNOS CC, CT or TT gene polymorphism types. In order to determine the MEFV gene mutations, FMF gene sequences were proliferated via using multiplex polymerase chain reactin method. Mutations were analyzed by using reverse in situ hybridization method. iNOS gene polymorphism was determined by PCR-RFLP method. Blood samples were collected from whole participants and plasma were separated to measure nitric oxide levels. Obtained biochemical and genetic data were statistically analyzed.

Results: In FMF group, the MEFV gene mutation rates were as follows: M694V homozygote (n=14; 23,33 %), M694V heterozygote (n=10; 16,67 %), M694V compound heterozygote (n=12; 20 %), other compound heterozygote (n=3; % 5) and other heterozygote (n=21; 35 %). There was no significant difference between the FMF group and controls by means of iNOS CC (p = 0,2917), CT (p = 0,5080) and TT (p = 0,5130) gene polymorphisms. Also, there was no statistically significant difference between the groups by means of plasma nitric oxide levels (p = 0,6434).

Conclusion: As a result, it can be councluded that there is no prominent change in plasma nitric oxide levels in FMF patients when compared with normal individuals and also there is no difference between the groups by means of iNOS gene polymorphism.

8. KAYNAKLAR

1. Bayraktar I, David H Van Thiel. Familial mediterranean fever (recurrent polyserositis): the gastroenterologist's viewpoint. Turk J Gasroenterol 1996; 7: 111-6.
2. Yuval Y, Hemo Zisser M, Zemer D, Sohar E, Pras M. Dominant inheritance in two families with familial mediterranean fever. Am J Med Genet 1995; 57: 455-7.
3. Ehrenfeld M, Pras M, Shoenfeld Y. Is FMF an autoimmune disease or an immune mediated condition ? First International Conference on Familial Mediterranean Fever. Freund Publishing House Ltd 1997; 267-74.
4. Dinarello CA, Wolff SM, Goldfinger SE, Dale DC, Alling DW. Colchicine therapy for familial Mediterranean fever. A double blind trial. N Engl J Med 1974; 291: 934-7.
5. Zemer D, Revach M, Pras M, Modan B, Schor S, Sohar E, Gafni J. A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial Mediterranean fever. N Engl J Med 1974; 291: 932-4.
6. Goldstein RC, Schwabe AD. Prophylactic colchicine therapy in familial Mediterranean fever. A controlled double blind study. Ann Intern Med 1974; 81: 792-4.
7. Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan B, Cabili S, Gafni J. Colchicine in the prevention and treatment of familial Mediterranean fever. N Engl J Med 1986; 314: 1001-5.
8. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. The International FMF Consortium. Cell 1997; 90: 797-807.
9. The French Consortium. A candidate gene for FMF. Nature Genet 1997; 17(1): 25-31.
10. Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, et al. Familial Mediterranean fever at the Millennium: clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institute of Health. Medicine 1998; 77(4): 268-97.

- Mediterranean Fever: The genetics of inflammation. *Hosp* 46.
12. Sunn T, Chan KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK and Lee SS: Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* 2001; 480-481: 243-68.
 13. Redington AE, Meng Q-H, Springall DR, Evans TJ, Créminon C, Maclouf J, Holgate ST, Howarth PH, Polak JM. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment . *Thorax* 2001; 56: 351-7.
 14. Schattner A, Gurevitz A, Zemer D, Hahn T. Induced TNF production in vitro as a test for familial Mediterranean fever. *QJM* 1996; 89: 205-10.
 15. Matzner Y, Abedat S, Shapiro E, Eisenberg S, Bar-Gil- Shitrit A, Stepensky P, Calco S, Azar Y, Urieli-Shoval S. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood* 2000; 96: 727-31.
 16. Muradkhanian KS, Arakelov GM. Changes in the concentration of histamine in the blood of patients and their relatives in familial cases of periodic disease. *Zh Eksp Klin Med* 1971; 11: 51-7.
 17. Panossian AG, Grigoryan SV, Davtian DG, Gevorkian GA, Gabrielian E. Arachidonic acid metabolism in the platelets of patients with familial Mediterranean fever. *Bull Exp Biol Med* 1986; 11: 561-3.
 18. Aisen PS, Haines KA, Given W, Abrahamson SB, Pras M, Serhan C, Hamberg M, Samuelsson B, Weissman G. Circulating hydroxy fatty acids in familial Mediterranean fever. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 1232-6.
 19. Gabrielian ES, Grigorian SV, Davtian DG, Mkhitarian GS, Panossian AG. The level of leukotrienes B4 and C4 in blood plasma of patients with familial Mediterranean fever. *Bull Exp Biol Med* 1990; 9: 296-7.
 20. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of NO, *J Biol Chem* 269 (1994) 13725-13728.
 21. Laskin JD, Heck DE, Laskin DL. Multifunctional role of NO in inflammation, *TEM* 5 (1994) 377-382.

- , Li J, Billiar TR. NO prevents IL-1b and IFN-c inducing from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1b-converting enzyme), *J. Immunol.* 161 (1998) 4122–4128.
23. Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Tweardy DJ. Essential role of induced NO in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 917–928.
 24. Wagner K, Young VR, Tannenbaum SR. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of 15 N into nitrate is enhanced by endotoxin treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60 (1983) 4581–4591.
 25. Farrel AJ, Blanke DG, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentration of nitrite in synovial fluid and serum samples suggested increased NO synthesis in rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.* 51 (1992) 1219–1222.
 26. Boockvar KS, Granger DI, Poston RM. NO produced during murine listeriosis is protective, *Infect. Immun.* 62 (1994) 1089–1100.
 27. Avontuur JA, Stam TC, Jongen-Lavrencic M, Van Amsterdam JG, Eggermont AM, Bruining HA. Effect of L -NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on plasma levels of IL-6, IL-8, TNF alpha and nitrite/nitrate in human septic shock, *Int Care Med.* 24 (1998) 673–679.
 28. Endo S, Inada K, Nakae H, Arakawa N, Takakuwa T, Yamada Y, Shimamura T, Suzuki T, Taniguchi S, Yoshida M. Nitrite/nitrate oxide (NO_x) and cytokine levels in patients with septic shock, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 91 (1996) 347.
 29. Roediger WEW, Lawson MJ, Nance SH, Radcliffe BC. Detectable colonic nitrate levels in inflammatory bowel diseases: mucosal or bacterial malfunction?, *Digestion* 35 (1986) 199–204.
 30. Thomsen LL, Brennum J, Iversen HK, Olesen J. Effects of nitrogen oxide donor glyceryl trinitrate on pressure pain threshold in humans, *Ugeskr. Laeger* 159 (1997) 4645–4648.
 31. Lalenti A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide, *Br. J. Pharmacol.* 110 (1993) 701–706.
 32. Gürler İliçin. Kas iskelet ve kollajen doku hastalıkları. İç Hastalıkları 2. Baskı

- k. İç Hastalıkları kitabı-1. Baskı. 2007; 302: 2167-2171.
34. Koşar C. Akdeniz Ateşine tanısal yaklaşım (diagnostic approach to familial Mediterranean fever). AUTD 2003; 35: 1-6.
35. Siegal S. Benign paroxysmal peritonitis. Ann Intern Med 1945;23:1-21.
36. Riemann HA. Periodic disease. Probable syndrome including periodic fever, benign paroxysmal peritonitis, cyclic neutropenia and intermittant arthralgia. JAMA 1948;136:239.
37. Mısıroğlu M, Yalcinkaya F, Akar E, Cakar N, Tümer N, Akcakus M, Tastan H, Matzner Y. MEFV mutations in Turkish patients suffering from FMF. Human mutation 2000; 15: 118-119.
38. Heller H, Sohar E, Sherf L. Familial Mediterranean fever. Arch Int. Med 1958; 102: 50.
39. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. Lancet 1998; 351:659-64.
40. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow JE, Prosen L, Dean M, Richards RI, Pras M, Kastner DL (1992). Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. N Eng J Med, 326:1509-13.
41. Goldfinger SE (1972). Colchicine for familial Mediterranean fever. N Eng J Med, 287: 1302.
42. Kastner DL, Aksentijevich I, Gruberg L, Balow J, Dean M, Hampsch K, Gazit E, Kovo M, Pras M (1991). Familial Mediterranean fever: a 90 markers exclusion map and evidence for linkage to chromosome 17. Cytogenet Cell Genet, 58: 2115..
43. Doğanavşargil E, Keser G (1999). Familial Akdeniz Ateşi. Klinik Romatoloji, İstanbul, Deniz Matbaası, Ege Romatoloji : 467-474.
44. La Regina MNG, Diaco M, Procopio A et al. (2004). Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. Eur J Hum Genet 12(2): 85 –6.
45. Kotone-Miyahara Y, Takaori-Kondo A, Fukunaga K, et al (2004). E148Q / M694I mutation in 3 Japanese patients with familial Mediterranean fever. Int J Hematol 79(3):235– 7.
46. Turkish FMF Study Group. (2005).Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey Results of a Nationwide Multicenter Study. Medicine 84: 1–11..

- Ozdemir O, Saatci U, Bakkaloglu A, Koroglu E, Tezcan
of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean
fever in Turkey: a field study. *J Rheumatol*.25: 2445–2449.
48. Dinc A, Pay S, Turan M, Simsek I (2000). Prevalence of familial Mediterranean fever in young Turkish men [abstract]. *Clin Exp Rheumatol*. 18:29
 49. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, Saatci U, Bakkaloglu A, Ozguc M (2001). Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet*, 9:553–555.
 50. Tunca M, Akar S, Hawkins PN, Booth SE, Sengul B, Yavuzsen TU, Oktem S, Soy Turk M, Akkoc N, Booth DR (2002). The significance of paired MEFV mutations in individuals without symptoms of familial Mediterranean fever. *Eur J Hum Genet*. 10:786–789.
 51. Rogers DB, Shohat M, Petersen GM, Bickal J, Schwabe AD, Rotter JI(1989). Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet*, 34: 168-172.
 52. Gersoni-Baruch R, Kepten I, Shinawi M, Brik R (1999). Direct detection of Common mutations in the familial Mediterranean fever gene (MEFV) using naturally occurring and primer mediated restriction fragment analysis. *Hum Mutat*, 14(1): 91-94.
 53. Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *N Eng J Med*. 2001;345:1748-1757.
 54. Papin S, Duquesnoy P, Cazeneuve C, Pantel J, Coppey-Moisan M, Dargemont C and Amsellem S. Alternative splicing at the MEFV locus involved in FMF regulates translocation of the marenostin/pyrin protein to the nucleus. *Hum. Mol. Genetic.*,2000;9(20): 3001-3009.
 55. Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon C, Aringer M, Farrel C, and Kastner DL. 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.
 56. Jack JCW, Mather IH(1990). Cloning and molecular analysis of cDNA encoding Bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and

- with the milk-fat globule membrane during lactation. *J*
-14486.
57. ROZENBAUM M, KATZ R, Rozner I et al. (1992). Decreased interleukin 1 activity released from circulating monocytes of patients with familial Mediterranean fever during in vitro stimulation by lipopolysaccharide. *J Rheumatol*, 19: 416-418.
 58. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, Gumucio DL (2001). Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC- induced apoptosis. *J Biol Chem*, 19: 39320-39329..
 59. Fairbrother WJ, Gordon NC, Humke EW, O'Rourke KM, Starovasnik MA, Yin JP, Dixit W (2001). The pyrin bölge: a member of the death bölge-fold superfamily. *Protein Sci*; 10(9): 1911-1918.
 60. Stehlik C, Reed JC (2004). The PYRIN connection: Novel players in innate immunity and inflammation. *J Exp Med* 200(5):551–8.
 61. Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A, Sagara J. (2002) SC, which composed of a PYD and CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, 293: 1314-1318..
 62. Papin S, Duquesnoy P, Cazeneuve C, Pantel J, Coppey-Moisan M, Dargemont C, Amselem S (2000). Alternative splicing at the MEFV locus involved in familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostin/pyrin protein to the nucleus. *Hum Mol Genetics*, 9(20): 3001-3009.
 63. McDermot MF (2002). Genetic clues to understanding periodic fevers, and possible therapies. *Trends Mol Med*, 8(12): 550-554..
 64. Mijatov V, Hompes PGA, Wouters GAJ (2002). Familial Mediterranean fever and its implications for fertility and pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108(2): 171-6.
 65. Bogdan C and Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 685: 713.
 66. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: Signaling mechanisms and biologic function. *Ann Rev Immunol* 1999, 17:701-

- DL. Familial autoinflammatory diseases: Genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17: 586-599.
68. 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.
69. Yılmaz E, Ozen S, Balci B, et al. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9: 553-555.
70. Mimouni A, Magal N, Stoffman N, Shohat T, Minasian A, Krasnov M, Halpern JG, Rotter IJ, Fischer-Ghondsian N, Danon LY, Shohat M. (2000). Familial Mediterranean Fever: Effect of Genotype and Ethnicity on Inflammatory Attacks and Amyloidosis. *Pediatrics*, 105 (5) p.e 70.
71. Yalçınkaya F, Çakar N, Mısırlıoğlu M, Tümer N, Akar N, Tekin M, Taştan H, Koçak H, Özkaya N, Elhan AH (2000). Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial Mediterranean fever: evidence for mutation independent amyloidosis. *Rheumatology*, 39: 67-72.
72. Mansour I, Delague V, Cazeneuve C, Dode C, Chouery E, Pecheux C, Medlej-Hashim M, Salem N, El Zein L, Levan-Petit I, Lefranc G, Goossens M, Delpech M, Amselem S, Loiselet J, Grateau G, Megarbane A, Naman R (2001). Familial Mediterranean fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Maronites, Greek orthodoxes, Greek catholics, Syrians and Chiites and for an association between amyloidosis and M694V and M694I mutations. *Eur J Hum Genet.* 9(1):51-5.
73. Sayarlıoğlu M, Cefle A, Inanc M, Kamalı S, Dalkılıç E, Gul A, Ocal L, Aral O (2004). Characteristics of patients with adult-onset familial Mediterranean fever in Turkey: analysis 401 cases. *Int J Clin Pract*, 59,2, 202-205.
74. Ozen S, Saatci, Balkana F, et al. FMF and polyarteritis nodosa. *Scand J Rheumatol* 1992;21:312-313.
75. Padeh S (2005) Periodic Fever Syndromes. *Pediatr Clin N Am* 52 577– 609.
76. Balci B, Tinaztepe K, Yilmaz E, Gucer S, Ozen S, Topaloglu R, Besbas N, Ozguc M, Bakkaloglu A (2002). MEFV gene mutations in familial Mediterranean fever

- with renal amyloidosis in childhood: a retrospective molecular study. *Nephrol Dial Transplant* 17(11):1921-3.
77. Gucuna A. Hereditary Periodic Fever Syndromes. Nelson E, Behrman E, et al (eds). *Textbook of Pediatrics*. Philadelphia, WB Saunders Comp. 2008.p.1030.
78. Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdoğan H, Kasapcopur O, Yalçinkaya F et al. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84(1): 1-11.
79. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Migdal A, Sohar E, et al. The changing face of familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 1996;26(3):612-627.
80. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heler H. Familial Mediterranean fever: A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med.* 1967; 43: 227-253.
81. Heler H, Gafni J, Michaeli D, Shahin N, Sohar E, Ehrlich G, et al. The arthritis of familial Mediterranean Fever. *Arthritis Rheum.* 1966; 9(1):1-17.
82. Schwabe AD, Peters RS. Familial Mediterranean fever in Armenians: Analysis of 100 cases. *Medicine* 1974; 53(6): 453-462.
83. Rawashdeh MO, Majeed HA. Familial Mediterranean fever in Arab children: the high prevalence and gene frequency. *Eur J Pediatr.* 1996; 155(7): 540-544.
84. Kees S, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Pras M, Livneh A. Attacks of pericarditis as a manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). *QJM* 1997; 90(10): 643-67.
85. Onen Fatos. Familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2006; 26(6): 489-496.
86. Michet CJ. Epidemiology of vasculitis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990; 16(2): 261-268.
87. Tekin M, Yalçinkaya F, Tümer N, Cakar N, Koçak H. Familial Mediterranean fever and acute rheumatic fever: a pathogenetic relationship? *Clin Rheumatol* 1999; 18(6): 446-449.
88. Langevitz P, Livneh A, Zemer D, Shemer J, Pras M. Seronegative spondyloarthritis in Familial Mediterranean fever. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 27(2): 67-72.
89. Cattan D, Notarnicola C, Molinari N, Touitou I. Inflammatory bowel disease in non-Ashkenazi Jews with familial Mediterranean fever. *Lancet* 2000; 355(9201):

- Hamzah Y, Tarawneh M, al-Khatib M. Ig A nephropathy in patients with familial Mediterranean fever. *Am J Nephrol* 1988; 8(5): 417-420.
91. Said R, Hamzeh Y, Tarawneh M, el-Khateeb M, Abdeen M, Shaheen A. Rapid progressive glomerulonephritis in patients with familial Mediterranean fever. *Am J Kidney Dis* 1989; 14(5): 412-416.
 92. Said R, Hamzeh Y. IgM nephropathy associated with familial Mediterranean fever. *Clin Nephrol* 1990; 33(5): 227-231.
 93. Eliakim M, Rachmilewitz M, Rosenmann E, Niv A. Renal manifestations in recurrent polyserositis (familial Mediterranean fever). *Isr J Med Sci.* 1970; 6(2): 228-245.
 94. Yalçinkaya F, Tümer N. Glomerüler lesions other than amyloidosis in patients with familial Mediterranean fever. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14(1): 21-23.
 95. Tekin M, Yalçinkaya F, Tümer N, Cakar N, Koçak H, Ozkaya N. Familial Mediterranean fever-renal involvement by diseases other than amyloid. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14(2): 475-479.
 96. Akpolat T, Akpolat I, Karagoz F, Yılmaz E, Kandemir B, Ozen S. et al. Familial Mediterranean fever and glomerulonephritis and review of the literature. *Rheumatol Int.* 2004; 24(1): 43-45.
 97. Falk RH, Comenzo RL, Skinner M. The systemic amyloidosis. *N Engl J Med.* 1997; 337(13): 898-909.
 98. Pras E, Livneh A, Balow JE, Pras E, Kastner DL, Pras M, et al. Clinical differences between North African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet.* 1998 Jan 13; 75(2): 216-219.
 99. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, et al. Criteria for the diagnosis of Familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997;40(10):1879-1885.
 100. Aral O, Ozdoğan H, Yazici H. The other physician behind the use of colchicine for the treatment of familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19(5): 13-14.
 101. Dianrello CA, Wolff SM, Goldfinger SE, Dale DC, Alling DW. Colchicine therapy for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1974; 291: 934-937.

- ent and periodic arthritic syndromes. A textbook of Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001;1400-1457.
103. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-26.
 104. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chadhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-69.
 105. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-66.
 106. Wink Da, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-56.
 107. Moilanen E, Whittle BJR, Moncada S. Nitric oxide as a factor in inflammation. In: *Inflammation: Principles and Clinical Correlations*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999; 787-800.
 108. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 14519-22.
 109. Lowenstein CJ, Glatt Cs, Bredt DS, Snyder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6711-15.
 110. Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S. Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419-23.
 111. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
 112. Geller DA, Lowenstein CR, Shapiro RA et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3491-5.

- M, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss
ng, characterization and expression of a cDNA encoding
an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad
Sci USA* 1993; 90:11419–23.
114. Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER. Purification and cDNA
sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line.
Biochemistry 1993; 32:11600–5.
115. Maier R, Bilbe G, Rediske J, Lotz M. Inducible nitric oxide synthase from
human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression.
Biochim Biophys Acta 1994; 1208:145–50.
116. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP et al. Molecular cloning, structure and
chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J
Biol Chem* 1994; 269:6765–72.
117. Marsden PA, Heng HHG, Duff CL, Shi XM, Tsui LC, Hall AV. Localization of
the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome
17q11.2-q12. *Genomics* 1994; 19:183–5.
118. Xu W, Charles IG, Liu L, Moncada S, Emson P. Molecular cloning and structural
organization of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2). *Biochem
Biophys Res Commun* 1996; 219:784–8.
119. Hall AV, Antoniou H, Wang Y et al. Structural organization of the human
neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem* 1994; 269: 33082–90.
120. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC,
Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive
endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268:17478–88.
121. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure,
polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene.
Biochem Biophys Res Commun 1994; 198:1027–33.
122. Xu W, Charles IG, Liu L, Koni PA, Moncada S, Emson P. Molecular genetic
analysis of the duplication of human inducible nitric oxide synthase (NOS2)
sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212:466–72.
123. Bloch KD, Wolfram JR, Brown DM et al. Three members of the nitric oxide
synthase II gene family (NOS2A, NOS2B, and NOS2C) colocalize to human

- ...ics 1995; 27:526–30.
- ...HY, Krishna G. An unprocessed pseudogene of inducible nitric oxide synthase gene in human. *NO Biol Chem* 1997; 1: 294–300.
125. Esumi H, Ogura T, Kurashima Y, Adachi H, Hokari A, Weisz A. Implication of nitric oxide synthase in carcinogenesis: analysis of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 166–70.
126. Bellamy R, Hill AVS. Short report on DNA marker at candidate locus: a bi-allelic tetranucleotide repeat in the promoter of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Clin Genet* 1997; 52:192–3.
127. Kun FJ, Mordmuller B, Lell B, Lehman LG, Luckner D, Kreamsner PG. Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet* 1998; 351:265–6.
128. Zhang X, Laubach VE, Alley EW, Edwards KA, Sherman PA, Russell SW, Murphy WJ. Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide / interferon-g. *J Leukocyte Biol* 1996; 59:575–85.
129. Spitsin SV, Farber JL, Bertovich M, Moehren G, Koprowski H, Michaels FH. Human- and mouse-inducible nitric oxide synthase promoters require activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and NF-kB. *Mol Med* 1997; 3:315–26.
130. Kolyada AY, Savikovsky N, Madias NF. Transcriptional regulation of the human iNOS gene in vascular-smooth-muscle cells and macrophages: evidence for tissue-specificity. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220:600–5.
131. De Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, Billiar TR, Geller DA. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1054–9.
132. Linn SC, Morelli PJ, Edry I, Cottongim SE, Szabo C, Salzman AL. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene in an intestinal epithelial cell line. *Am J Physiol* 1997; 272: 1499–508.
133. Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochem*

- 994; 200: 802–7.
134. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1994; 12: 5447–54.
135. 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;1(8378): 656-657.
136. Barakat MH, Gumaa KA, Malhas LN, el-Sobki NI, Moussa MA, Fenech FF. Plasma dopamine beta-hydroxylase: Rapid diagnostic test for recurrent hereditary polyserositis. *Lancet* 1988; 2(8623): 1280-1283.
137. Matzner Y, Brzezinski A. C5a-inhibitor deficiency in peritoneal fluids from patients with familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1984; 311(5): 287-290.
138. Reimann HA, Coppola ED, Villegas GR. Serum complement defects in periodic diseases. *Ann Intern Med* 1970; 73(5): 737-740.
139. Akar N, Mısırlıoğlu M, Yalçınkaya F, Akar E, Çakar N, Turner N, Akçakut M, Taştan H, Matzner Y. MEFV mutations in Turkish patients suffering from Familial Mediterranean fever. *Hum Mut. Wiley- Liss.Inc.* (1999).
140. Bakkaloğlu A. ‘Familial Mediterranean fever’, *Pediatr Nephrol.* 18: 853-859 (2003).
141. Topaloğlu R, Özaltın F, Yılmaz E. E148Q is a disease causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever. *Ann. Rheumatic Dis.* (2004).
142. Doğan Demir A. ‘Çocukluk Çağı Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Klinik ve Epidemiyolojik Özelliklerin Belirlenmesi ve Bu Özelliklerle Sık Görülen Mutasyonlar Arasındaki İlişkilerin Araştırılması’, Uzmanlık Tezi, İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Kliniği, İstanbul (2007).
143. Yeşilada E, Savacı S, Yüksel Ş, Gülbay G, Otlu G, Kaygusuzoğlu E. ‘Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Düşünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları’, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 12(4): 235-238.
144. Dahlback B, Carlsson M, Svenson PJ: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized characterized by poor anticoagulant response to activated Prediction

- ed protein C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1004-1008
145. Roland C, Karch H. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron* 2002; 90: 373-8.
 146. Wu CC. Nitric oxide and inflammation. *Curr Med Chem* 2004; 3(3): 217-22.
 147. Cirino G, Distrutti E, Wallace WJ. Nitric oxide and inflammation. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 2006, 5, 115-9.
 148. Panossian A, Hambartsumyan M, Panosyan L, Abrahamyan H, Mamikon yan G, Gabrielyan E, Amaryan G, Astvatsatryan V, Wikman G. Plasma nitric oxide level in familial Mediterranean fever and its modulations by Immuno-Guard. *Nitric Oxide* 2003; 9(2): 103-10.
 149. Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal JS, Amouyel P, Tzourio C, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Hum Mol Genet* 2003; 12(1): 79-86.
 150. Goto Y, Ando T, Naito M, Goto H, Hamajima N. Inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with the increased risk of differentiated gastric cancer in a Japanese population.
 151. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sanchez E, Lopez-Nevot M, Amoli MM, Garcia-Porrúa C, Ollier WER and Martin J. Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology* 2004; 43: 1182-5.
 152. Martin J, Paco L, Ruiz MP, Lopez-Nevot M, Garcia-Porrúa C, Amoli MM, Calviño MC, Ollier WER, Gonzalez-Gay MA. Inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to Henoch-Schönlein purpura in northwestern Spain. *The Journal of Rheumatology* June 1, 2005 vol. 32 no. 6 1081-5.
 153. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K. Significant association of longer forms of CCTTT Microsatellite repeat in the inducible nitric oxide synthase promoter with severe malaria in Thailand. *J Infect Dis* 2002; 186(4): 578-81.
 154. Holla LI, Stejskalova A, Znojil V, Vasku A. Analysis of the inducible nitric

- polymorphisms in Czech patients with atopic diseases. Clin
(2): 1592-1601.
155. Qu T, Tang T, Cao D, Wu F, Liu J, Lu G, Zhang Z and Xia Z. Genetic
polymorphisms in alveolar macrophage response-related genes and risk of
silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners.
156. Gonzalez-Gay MA, Oliver J, Sanchez E, Garcia-Porrúa C, Paco L, Lopez-Nevot
MA, Ollier WE, Martin J. Association of a functional inducible nitric oxide
synthase promoter variant with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis.
J Rheumatol 2005 Nov; 32(11): 2178-82.
157. Johannesen J, Pie A, Pociot F, Kristiansen OP, Karlsen AE, Nerup J. Linkage of
the human inducible nitric oxide synthase gene to type 1 diabetes. J Clin
Endocrinol Metab 2001; Jun; 86(6): 2792-6.